

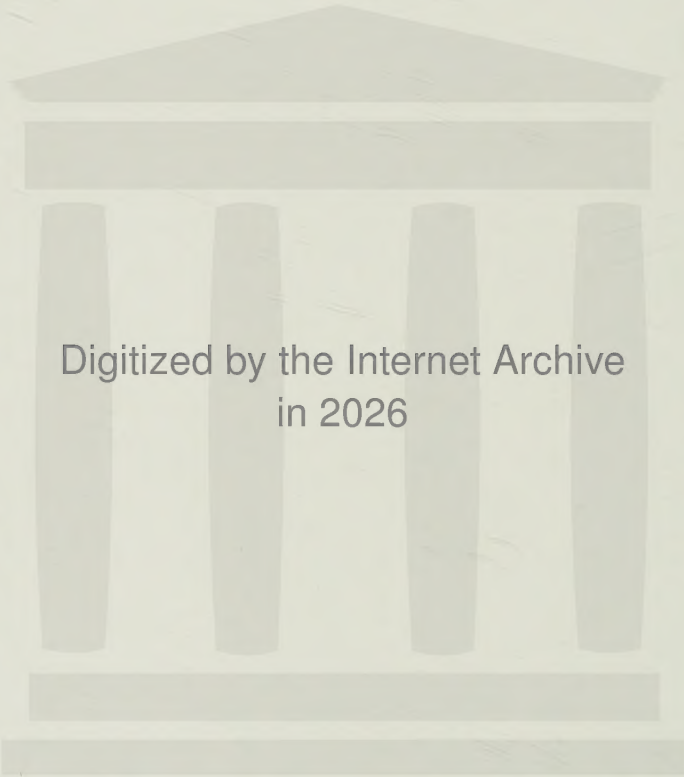
**BIOPHYSIKALISCHE UND BIOCHEMISCHE  
CHARAKTERISIERUNG DES RHIZOBIUM-GENOMS**

von  
**Barbara Merkt**  
aus  
Leipzig

1979 # 191







Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41546211\\_0002](https://archive.org/details/IA41546211_0002)

# **BIOPHYSIKALISCHE UND BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG DES RHIZOBIUM-GENOMS**

Den Naturwissenschaftlichen Fachbereichen  
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

zur  
Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt

von

**Barbara Merkt**

aus

**Leipzig**

Als Dissertation genehmigt  
von den Naturwissenschaftlichen Fachbereichen  
der Universität Erlangen-Nürnberg



Tag der mündlichen Prüfung:

30. Mai 1979

Vorsitzender der Promotionskommission:

Prof. Dr. E. Schweizer

Erstberichterstatter:

Prof. Dr. W. Heumann

Zweitberichterstatter:

Univ.-Doz. Dr. W. Lotz

# Inhaltsverzeichnis

Seite

|       |                                                          |    |
|-------|----------------------------------------------------------|----|
| 1.    | Zusammenfassung                                          | 1  |
| 2.    | Einleitung                                               | 3  |
| 3.    | Material                                                 | 5  |
| 3.1   | Bakterienstämme                                          | 5  |
| 3.2   | Nährmedien                                               | 6  |
| 3.3   | Lösungen                                                 | 6  |
| 3.4   | Enzyme                                                   | 9  |
| 3.5   | Sonstige Reagentien                                      | 9  |
| 4.    | Methoden                                                 | 10 |
| 4.1   | Anzucht der Bakterien                                    | 10 |
| 4.2   | Präparation von chromosomaler und extrachromosomaler DNA | 10 |
| 4.2.1 | Sarkosyllyse                                             | 10 |
| 4.2.2 | CsCl-EtBR-Dichtegradientenzentrifugation                 | 11 |
| 4.2.3 | Aufarbeitung von DNA                                     | 11 |
| 4.3.  | Bestimmung des GC-Gehalts                                | 11 |
| 4.3.1 | Schmelzanalysen                                          | 12 |
| 4.3.2 | Dichtemessungen                                          | 12 |
| 4.4   | Radioaktive in vitro-Markierung                          | 13 |
| 4.5   | Filterhybridisierung                                     | 13 |
| 4.5.1 | Vorbereitung der zu untersuchenden DNA                   | 14 |
| 4.5.2 | Vorbereitung der radioaktiven DNA                        | 14 |
| 4.5.3 | Renaturierung denaturierter DNA                          | 14 |
| 4.6   | Reassoziationskinetiken                                  | 15 |
| 4.6.1 | Reassoziierung denaturierter DNA                         | 15 |
| 4.6.2 | Hydroxylapatitchromatographie                            | 16 |

|       | Seite                                                                                                    |    |
|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.7   | Reinigung von Restriktionsenzymen                                                                        | 16 |
| 4.8   | Restriktionsanalyse                                                                                      | 17 |
| 4.8.1 | Spaltung von DNA                                                                                         | 17 |
| 4.8.2 | Agarosegelelektrophorese                                                                                 | 17 |
| 4.8.3 | Auswertung der Gele                                                                                      | 18 |
| 4.9   | Darstellung von Plasmid-DNA im<br>Elektronenmikroskop                                                    | 18 |
| 4.9.1 | Droplet-Methode                                                                                          | 19 |
| 4.9.2 | Spreitung von DNA                                                                                        | 19 |
| 4.9.3 | Längenmessung von Plasmid-DNA                                                                            | 19 |
| 5.    | Ergebnisse                                                                                               |    |
| 5.1   | GC-Gehalt und Heterogenität von Rhizo-<br>bium-Segreganten                                               | 21 |
| 5.2   | DNA-Dichten von Rhizobium-Stämmen und<br>ihren Segreganten gemessen im CsCl-<br>Gradienten               | 24 |
| 5.3   | Extrachromosomale DNA in Rhizobium-<br>Stämmen und ihren Segreganten                                     | 27 |
| 5.4   | In vitro-Markierung und Filterhybridi-<br>sierung der DNA von Rhizobium-Stämmen<br>und ihren Segreganten | 32 |
| 5.5   | Reassoziaton von Rhizobium-Stämmen<br>und ihren Segreganten                                              | 36 |
| 5.5.1 | Prinzip der Methode                                                                                      | 36 |
| 5.5.2 | Theorie                                                                                                  | 36 |
| 5.5.3 | Hybridisierungsraten                                                                                     | 37 |
| 5.6   | Fragmentmuster von Rhizobium-Stämmen<br>ihren Segreganten                                                | 47 |
| 6.    | Diskussion                                                                                               | 50 |
|       | Literatur                                                                                                | 60 |

## 1. Zusammenfassung

Es ist das Ziel dieser Arbeit, durch DNA-Analysen von *Rhizobium*-Wild-Typ-Stämmen (WT) und ihren Segreganten, zum Verständnis der genetischen Organisation dieser Bakteriengattung beizutragen. Hierzu wurde der GC-Gehalt der verschiedenen Stämme gemessen sowie ihre Basenhomologie durch Filterhybridisierung und Reassoziaton untereinander verglichen. Weiterhin wurde ihre Gesamt-DNA mit den Restriktionsendonukleasen Xba und Xho fragmentiert und die Bandenmuster untereinander verglichen. Da alle WT-Stämme sowie ihre freilebend Stickstoff bindenden Segreganten (nif-Typ) extrachromosomale DNA besitzen, wurde diese von der chromosomalen DNA getrennt und ihre biophysikalischen Daten bestimmt.

Die GC-Werte aller untersuchten Stämme liegen zwischen 59 und 67%. Die Basenhomologie der WT-Stämme verschiedener Wirtsgruppen ist innerhalb derselben Wirtsgruppe verschieden hoch, z.B. bei allen *Rhizobium meliloti*-Stämmen 91 - 100%, bei *R. leguminosarum* 67 - 73%, bei *R. japonicum* 44%. Zwischen den Wirtsgruppen ist die Homologie der DNA geringer. Die Homologie innerhalb einzelner Segregantenklassen liegt zwischen 75 und 100%, während Segreganten-DNA mit WT-DNA zum Teil bis zu 50% homolog ist. Die Homologie zwischen den verschiedenen Segregantenklassen ist gering.

Die extrachromosomale DNA der WT-Stämme und der nif-Typ-Segreganten besitzt einheitliche Dichten von  $\rho = 1,717 \text{ g/cm}^3$ , ebenso sind die großen Plasmide aus WT und nif-Typ in ihrer Länge identisch. Sie liegen zwischen 80 und 110 um. Die Restriktionsmuster von extrachromosomaler DNA aus verschiedenen WT-Stämmen sind jedoch weitgehend verschieden. Die Dichte der chromosomalen DNA der Minimal-Typ-Segregante (min-Typ) gleicht mit  $\rho = 1,717 \text{ g/cm}^3$  der der Plasmid-DNA aus WT bzw. nif-Typ.

Die hiermit vorliegenden DNA-Analysen der Rhizobien geben einen ersten Einblick in die außerordentlich komplexe und variable Organisation ihres Genoms.

## 2. Einleitung

Der Fragestellung dieser Arbeit liegt die Beobachtung zu Grunde, daß Wild-Typ-Rhizobien (WT), also nodulierende, effektive Stämme unter bestimmten Kulturbedingungen segregieren. Die Segreganten unterscheiden sich untereinander und vom Wildtyp in vielen physiologischen und genetischen Merkmalen. Da aus allen bisher untersuchten WT-Stämmen immer die gleichen Segreganten entstehen, ist es möglich, diese zu klassifizieren. Das Segregantenmuster sieht folgendermaßen aus:

| <u>Ausgangsstamm</u> | <u>Segreganten</u>            |
|----------------------|-------------------------------|
| WT                   | nif-Typ<br>car-Typ<br>min-Typ |
| nif-Typ              | car-Typ<br>min-Typ            |
| car-Typ              | min-Typ                       |
| min-Typ              | keine Segreganten             |

Tabelle 1: Rhizobiumsegregation

WT = Wild-Typ  
nif-Typ = freilebend Stickstoff bindend  
car-Typ = carotinoid pigmentiert  
min-Typ = Endstadium der Segregation

Dieses Phänomen der Segregation spiegelt vermutlich den evolutions-geschichtlichen Aufbau von WT-Rhizobien wieder. Um diesen Aufbau zu verstehen, muß eine möglichst große Zahl an genetischen, biophysikalischen und biochemischen Daten der Genome der beteiligten Bakterien bekannt sein. Ein Teil dieser

Daten wird durch vorliegende Arbeit bestimmt und miteinander verglichen. Es handelt sich vornehmlich um folgende Merkmale: DNA-Dichten, Basenhomologien, Restriktionsmuster der Endonukleasen Xba und Xho, sowie die Charakteristika extrachromosomaler DNA.

### 3. Material

#### 3.1 Bakterienstämme

| WT-Rhizobien    | Stamm-Nr. | Herkunft                     |
|-----------------|-----------|------------------------------|
| R.leguminosarum | 300       | Beringer, Norwich            |
|                 | 30132     | DSM, Göttingen               |
|                 | LVII-1    | Stammsammlung, Erlangen      |
|                 | 30137     | DSM, Göttingen               |
|                 | TVI-1     | Stammsammlung, Erlangen      |
| R.phaseoli      | 30137     | DSM, Göttingen               |
| R.trifolii      | 30141     | DSM, Göttingen               |
|                 | 0403      | Dazzo, USA                   |
|                 | D376      | Hamatova, CSSR               |
|                 | 2011      | Denarie, Versailles          |
| R.meliloti      | Sa10B61   | "                            |
|                 | 20-26     | Nitritmutagenese von Sa10B61 |
|                 | AK208     | Orosz, Szeged                |
|                 | MVII-1    | Stammsammlung, Erlangen      |
|                 | H13-3     | Gabor, USA                   |
| R.lupini        | 10319     | ATCC, USA                    |
|                 | D75       | Hamatova, CSSR               |
|                 | Wu425     | CSIRO, Australien            |
|                 | CB1809    | CSIRO, Australien            |
| R.japonicum     | 3Ib1      | US-Department of Agriculture |

#### Rhizobium-Segreganten

|         |                     |                         |
|---------|---------------------|-------------------------|
| nif-Typ | 30-1, 30-13, 30-14  | Stammsammlung, Erlangen |
| car-Typ | 1-34, 1-44, 1-56,   | "                       |
|         | 1-99, 1-776, 1-924, |                         |
|         | 1-925d, 1-926       |                         |
| min-Typ | 1-925a              | "                       |

DSM Deutsche Sammlung von Mikroorganismen

ATCC American Type Culture Collection

CSIRO Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization

### 3.2 Nährmedien

LL: Vollmedium 8 g/l (Lab Lemco)

NB: Vollmedium 10 g/l (Nutrient Broth, Difco)

YMB: In 1 l dieses Vollmediums sind enthalten:

0,5 g  $K_2HPO_4$

0,1 g NaCl

0,4 g Yeast Extrakt (Difco)

10 g Mannit

0,2 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

TY: In 1 l dieses Vollmediums sind enthalten:

5 g Bacto-Tryptone (Difco)

3 g Yeast-Extrakt (Difco)

1,3 g  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$

### 3.3 Lösungen

TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5

SSC-Puffer: 150 mM NaCl, 15 mM Na-Citrat

TES-Puffer: 50 mM Tris/HCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl, pH 8.1

NES-Puffer: 3 M NaCl, 10 mM EDTA, 0,5% Sarkosyl, pH 8.1

PC-Puffer: 10 mM  $K_2SO_4$  pH 7.4, 10 mM Mercaptoäthanol,  
100 mM EDTA, 10% Glycerin

Xba-Xho-Puffer: 6 mM Tris, 6 mM  $MgCl_2$ , 6 mM Mercaptoäthanol,  
pH 7.9

Eco RI-Puffer: 10 mM Tris, 10 mM  $MgCl_2$ , 100 mM NaCl, 10 mM Mer-  
captoäthanol, pH 7.5

Sma-Puffer: 15 mM Tris, 6 mM  $MgCl_2$ , 15 mM KCl, pH 8.5

Tris-Acetatpuffer für Agarosegele:

40 mM Tris

10 mM Na-Acetate

5 mM EDTA

pH 7.8

Elutionspuffer für Sephadex G 50 Säule:

10 mM Tris/HCl  
1 mM EDTA  
0,001% Sarkosyl NL 30  
pH 7.5

Stopplösung für Verdauungsreaktionen:

25% Sucrose  
2,5 M Harnstoff  
250 mM EDTA pH 8.0  
5 % SDS  
0.1% Bromphenolblau

Toluolscintillator:

4 g PPO  
0.2 g POPOP  
660 ml Toluol  
333 ml Triton X-100

Lösung "kalter Triphosphate"

50 mM  $MgCl_2$   
5 mM  $K-PO_4$ -Puffer pH 7.4  
750 uM ( $Na_2$ -Salz, Merck, Darmstadt)  
350 mM Tris/HCl pH 7.4  
5 mM EDTA  
100 uM dATP ( $Na_2$ -Salz, Serva, Heidelberg)  
100 uM dGTP ( $Na_3$ -Salz, Merck, Darmstadt)  
5 mM Dithiothreitol

Verdünnungspuffer für Polymerase I:

50 mM Tris/HCl pH 7.4  
100 mM KCl  
10 mM 2-Mercaptoethanol  
7 mM  $MgCl_2$   
50% Glycerin

#### Uranylacetatlösung für Positivkontrastierung:

50 uM Uranylacetat  
0,5 uM HCl  
in 90% Äthanol

#### Spreadinglösung für Elektronenmikroskopie:

10 mM EDTA pH 8.5  
30% Formamid  
100 mM Tris/HCl

### 3.4 Enzyme

Die Restriktionsenzyme Xba, Xho, EcoRI und Sma wurden von Dr. Rösch an unserem Institut in Erlangen aus den Bakterienstämmen *Xanthomonas badrii*, *Xanthomonas holcicola*, *Escherichia coli* und *Serratia marcescens* isoliert und gereinigt.

RNase aus Rinderpankreas (Serva, Heidelberg)

DNase aus Rinderpankreas (Serva, Heidelberg)

Lysozym aus Hühnereiweiß (Boehringer, Mannheim)

### 3.5 Sonstige Reagentien

Tris (-hydroxymethyl)aminomethan (Tris) (Merck, Darmstadt)

CsCl (Merck, Darmstadt)

2,5-Diphenyloxazol (PPO) (Merck, Darmstadt)

1,4 -Bis [2,(5-phenyl)oxazolyl] benzol (POPOP) (Merck, Darmstadt)

Triton X-100 (Serva, Heidelberg)

2-Mercaptoäthanol (Serva, Heidelberg)

Äthidumbromid (EtBR) (Serva, Heidelberg)

Cytochrom C (Serva, Heidelberg)

Visking Dialysierschlauch (Serva, Heidelberg)

ATP (Miles, Dietzenbach)

Agarose-Seakem (MCI, Rockland, Maine, USA)

Nitrozellulosefilter (Sartorius, Göttingen)

<sup>3</sup>H-Desoxythymidin-Triphosphat (Amersham-Buchler)

Hydroxylapatit DNA-Grade (Biorad, München)

Sephadex G 50 fine (Pharmacia, Uppsala)

Phosphozellulose P1 (Whatman)

DEAE-Zellulose DE52 (Whatman)

Chromosomale DNA aus *Micrococcus luteus* und *Escherichia coli* wurde vom Labor Dr. Pühler unseres Instituts in Erlangen zur Verfügung gestellt.

#### 4. Methoden

##### 4.1 Anzucht der Bakterien

Die Bakterien wurden in dem jeweils für sie geeigneten Flüssigmedium bei 30° C unter Belüftung angezogen. Rhizobium-Segreganten wuchsen am besten in LL-Medium. Für alle übrigen Rhizobien, bis auf den Rhizobium lupini Stamm Wu 425, wurde TY-Medium verwendet. Wu 425 benötigte YMB-Medium pH 5.0.

##### 4.2 Präparation von chromosomaler und extrachromosomaler DNA

Logarithmisch gewachsene Bakterien wurden zunächst einer totalen Lyse durch Lysozym und Sarkosyl ausgesetzt. Dabei wird bis auf die Lysozym- und Sarkosyleinwirkung sowie Scherbedingungen nach der Methode von Bazaral /Bazaral und Helinski, 1968/ verfahren. Die Trennung von chromosomaler und extrachromosomaler DNA erfolgt dann im CsCl-EtBR-Gradienten /Radloff et al., 1967/.

###### 4.2.1 Sarkosyllyse

- Anzucht von 30 - 40 ml Flüssigkultur
- Ernte der Bakterien durch niedertourige Zentrifugation
- Zellen in 0.75 ml 20 % Sucrose in 1 x TES resuspendieren
- Zugabe von 1 ml einer Lösung aus Lysozym (2 mg/ml) und RNase (1 mg/ml) in 20 % Sucrose in 1 x TES
- 1 Stunde bei 37° C im Wasserbad inkubieren
- 0,3 ml einer 10 % Sarkosyllösung in 0.25 M EDTA zugeben
- 0.3 ml EtBR-Lösung (10 mg/ml) zugeben
- Vorsichtiges Scheren der DNA mit einer 2-ml-Plastikspritze
- Zugabe von 2.7 ml 1 x TES zum Lysat
- Einwaage von 5 g CsCl

#### 4.2.2 CsCl-EtBR-Dichtegradientenzentrifugation

Die mit CsCl-EtBR versetzten Zellsate werden in 50-Ti-Röhrchen gefüllt und zum Abdichten mit dünnflüssigem Paraffin überschichtet. Anschließend werden die Lysate mindestens 48 Stunden bei 25° C und 34.000 Rpm in der präparativen Ultrazentrifuge zentrifugiert. Nach dem Lauf wird die chromosomale und extrachromosomale DNA durch Bestrahlen der 50-Ti-Röhrchen mit langwelligem UV-Licht (360 nm) sichtbar gemacht. Beide Banden werden dann getrennt mit einer Plastikspritze abgezogen. Die aus mehreren Gradienten gesammelte Plasmid-DNA wird zur Konzentrierung einer nochmaligen Zentrifugation in einem CsCl-EtBR-Gradienten unterworfen. Die Zentrifugation geschieht unter den bereits oben beschriebenen Bedingungen.

#### 4.2.3 Aufarbeitung von DNA

Nach Entfernen aus dem CsCl-EtBR-Gradienten wird die DNA-Lösung mit Isoamylalkohol 1:1 versetzt und geschüttelt. Zur sauberen Phasentrennung wird kurz niedertourig zentrifugiert. Die DNA-haltige farblose Phase wird vorsichtig abgezogen und über Nacht gegen TE-Puffer dialysiert. Anschließend wird die DNA-Lösung zur Deproteinisierung zweimal mit Tris gesättigtem Phenol geschüttelt und 10 Minuten bei 10.000 Rpm zentrifugiert. Die obere DNA-haltige Phase wird abgenommen und mehrmals gegen TE-Puffer dialysiert. Die so erhaltene DNA wird zur Reinheitskontrolle und zur Konzentrationsbestimmung im Gilford Photometer vermessen.

#### 4.3 Bestimmung des GC-Gehalts

Eine charakteristische Größe für jede DNA ist ihr GC-Gehalt. Dieser läßt sich ermitteln durch Bestimmung des Schmelzpunktes  $T_m$  /Marmur und Doty, 1962/ oder der Dichte  $\rho$  /De Ley, 1970/. Der Schmelzpunkt ergibt sich graphisch aus Schmelzkurven. Die Dichte einer DNA erhält man über analytische Ultrazentrifugation in Gegenwart von Referenz-DNA.

#### 4.3.1 Schmelzanalysen

Die zu untersuchende DNA (Konzentration 50 ug/ml) sowie Referenz DNA (E.coli-DNA, Konzentration 50 ug/ml) wird zunächst gegen Natriumphosphatpuffer ( $M_{Na^+} = 0.04 \text{ mol/l}$ ) dialysiert. Dann füllt man in die drei nebeneinander liegenden Kammern der Thermoküvette des Gilford Photometers die zu untersuchende DNA, die Referenz-DNA und reinen Natriumphosphatpuffer (ebenfalls  $M_{Na^+} = 0.04 \text{ mol/l}$ ). Die Thermoküvette wird nun mit einer Heizrate von  $0.25^\circ \text{ C/min}$  aufgeheizt. Die Änderung der optischen Dichte der schmelzenden DNA wird in Abhängigkeit von der jeweiligen Temperatur von einem Schreiber aufgezeichnet. Aus den so erhaltenen Kurven wird der Schmelzpunkt  $T_m$  graphisch ermittelt. Aus der Steilheit der Schmelzkurve kann auf die Heterogenität des GC-Gehalts geschlossen werden /Mandel und Marmur, 1968/.

#### 4.3.2 Dichtemessungen

In 0.36 ml TE-Puffer gibt man 5 - 10 ul zu messende DNA-Lösung (Konzentration 200 - 500 ug/ml), 2 ul Referenz-DNA-Lösung und soviel CsCl ( $\sim 0.5 \text{ g}$ ) bis die Lösung eine Dichte von  $1.71 \text{ g/cm}^3$  hat. Eine zweite CsCl-Lösung ( $\rho = 1.71 \text{ g/cm}^3$ ) ohne DNA dient als Vergleichslösung. Beide Lösungen füllt man in eine Doppelsektorzelle und zentrifugiert in einem An-F-Ti-Rotor in der analytischen Ultrazentrifuge 20 Stunden bei 44.000 Rpm und  $25^\circ \text{ C}$ . Die DNA-Dichteverteilung im CsCl-Gradienten wird über eine UV-Optik registriert und vom Schreiber aufgezeichnet. Mithilfe der bekannten Dichte der Referenz-DNA läßt sich die Dichte der zu untersuchenden DNA berechnen /Ifft et al., 1961/.

$$\rho = \rho_i + \frac{\omega^2}{2\beta} (r^2 - r_i^2)$$

$\rho$  Dichte der Proben-DNA

$\rho_i$  Dichte der Referenz-DNA

$\beta$  konstanter Faktor :  $1.19 \cdot 10^9$

- $\omega$  Winkelgeschwindigkeit
- r Abstand des Proben-DNA-Gipfels von der Rotorachse
- $r_i$  Abstand des Referenz-DNA-Gipfels von der Rotorachse

#### 4.4 Radioaktive in vitro-Markierung

Die radioaktive Markierung von DNA erfolgt über "nick translation" /Rigby et al., 1977/. Diese Methode liefert DNA mit einer sehr hohen spezifischen Aktivität. Zunächst werden  $10 \text{ nM } ^3\text{H-TdR}$  lyophilisiert und in  $98 \text{ ul}$  abgekochtem Wasser (bidest) aufgenommen. Dazu gibt man  $20 \text{ ul}$  (=  $10 \text{ ug}$  bakterielle DNA) DNA-Lösung und  $50 \text{ ul}$  einer Lösung aus "kalten" Triphosphaten. Diese Mischung wird  $10$  Minuten bei  $17^\circ \text{ C}$  vorinkubiert. Dann setzt man noch  $62,5 \text{ ul}$  DNase-I-Lösung ( $100 \text{ ug/ml}$ ) und  $20 \text{ ul}$  Polymerase-I-Lösung (=  $10$  Enzymeinheiten) zu und inkubiert  $1$  Stunde bei  $17^\circ \text{ C}$ . Nach Beendigung der Reaktion füllt man den Markierungsansatz mit  $750 \text{ ul}$  Wasser auf und extrahiert mit  $1 \text{ ml}$  Phenol (gesättigt mit  $20 \text{ mM}$  Tris,  $10 \text{ mM}$  EDTA, pH 8,1). Anschließend trägt man die wässrige DNA-haltige Phase auf eine Sephadex G 50 fine Säule ( $10 \times 300 \text{ mm}$ ) auf und eluiert mit einem Puffer aus  $10 \text{ mM}$  Tris,  $1 \text{ mM}$  EDTA,  $0,1 \%$  Sarkosyl, pH 7,4.  $10$  Tropfen pro Fraktion werden gesammelt und jeweils  $10\text{-ul}$ -Proben aus jeder Fraktion im Szintillationszähler ausgezählt. Trägt man die gemessene Radioaktivität jeder einzelnen Probe gegen ihre Fraktionsnummer auf, so erhält man zwei Gipfel. Gipfel eins enthält die radioaktiv markierte DNA, Gipfel zwei die nicht eingebauten Triphosphate. Die Fraktionen von Gipfel eins werden gepoolt und die Radioaktivität durch Auszählen einer  $10\text{-ul}$ -Probe bestimmt. Ein Maß für die Höhe der Markierung ist dann die Radioaktivität, die pro  $\text{ug}$  eingesetzte bakterielle DNA, eingebaut wurde. Die radioaktive DNA wird in Portionen zu je  $250 \text{ ul}$  abgefüllt und bei  $-70^\circ \text{ C}$  eingefroren.

#### 4.5 Filterhybridisierung

Bakterielle DNA wurde mithilfe der Methode der Filterhybridisierung /Gillespie und Spiegelmann, 1965/ auf Basenhomologie

untersucht. Dazu wird die DNA zunächst durch Alkalibehandlung und Hitze denaturiert, auf Filtern fixiert und anschließend in Gegenwart einer geeigneten radioaktiven DNA renaturiert.

#### 4.5.1 Vorbereitung der zu untersuchenden DNA

- 50 µg bakterielle DNA mit 0.1 x SSC auf 2 ml auffüllen
- 0.4 ml 2 N NaOH zum Denaturieren zugeben
- 15 Minuten im Wasserbad kochen
- im Eisbad abschrecken
- 0.1 ml 1 N Tris/HCl, pH 7.5 zugeben
- mit 0.4 ml 2 N HCl neutralisieren
- durch Zugabe von 1,3 ml 20 x SSC wird die DNA-Lösung auf 6 x SSC eingestellt
- 2.15 ml der DNA-Lösung auf Nitrozellulosefilter saugen, die in 6 x SSC vorgequollen wurden
- DNA-haltige Filter 4 Stunden bei 80° C im Trockenschrank trocknen

#### 4.5.2 Vorbereitung der radioaktiv markierten DNA

- Radioaktive DNA (200 000 cpm/Filter) mit 0.01 x SSC auf 2 ml auffüllen
- 0.4 ml 2 N NaOH zum Denaturieren zugeben
- 15 Minuten im Wasserbad kochen
- im Eisbad abschrecken
- 0.2 ml 1 N Tris/HCl, pH 7.5 zugeben
- mit 0.4 ml 2 N HCl neutralisieren
- mit 1 ml H<sub>2</sub>O (bidest) auf 4 ml auffüllen
- mit 6 ml 10 x SSC, 0.5% SDS radioaktive DNA-Lösung auf 6 x SSC einstellen

#### 4.5.3 Renaturierung denaturierter DNA

Die getrockneten Nitrozellulosefilter werden in Scintillationsgefäßen mit der vorbereiteten radioaktiven DNA-Lösung über-

schichtet. Die Renaturierung der DNA findet bei 65° C in einem Schüttelwasserbad über 22 Stunden statt. Die Filter werden anschließend dreimal mit 250 ml 2 M Tris von jeder Seite gründlich durchgespült und in 10 ml Toluolscintillator aufgelöst. Die Proben werden dann 4 Minuten im Scintillationszähler gezählt.

#### 4.6 Reassoziationskinetiken

Die Reassoziaton /Wetmur und Davidson, 1968/ gibt, wie die bereits beschriebene Filterhybridisierung, Auskunft über den Verwandtschaftsgrad verschiedener DNA. Bei dieser Methode nimmt man jedoch im Gegensatz zur Filterhybridisierung eine Kinetik der Renaturation von DNA in Gegenwart von geeigneter radioaktiv markierter DNA auf. Um den Hybridisierungsgrad zu einer bestimmten Zeit festzustellen, trennt man radioaktive Einzel- und Doppelstränge über Hydroxylapatitchromatographie /Britten und Kohne, 1971/.

##### 4.6.1 Reassoziaton denaturierter DNA

Die aus den entsprechenden Bakterien isolierte DNA wird gegen TE-Puffer dialysiert und in silikonisierten Gläschen zu 150 - 250 µg/ml lyophilisiert. Die lyophilisierten Nukleinsäuren werden in jeweils 50 µl NES-Puffer gelöst. Dazu gibt man 20 µl <sup>3</sup>H-markierte bakterielle DNA (= 20.000 cpm) und füllt mit H<sub>2</sub>O (bidest) auf 0.35 ml auf. Nach Zugabe von 50 µl 2 N NaOH werden die Proben bei 100° C, 10 Minuten im Wasserbad denaturiert, bei 4° C im Eisbad abgeschreckt und mit einer Mischung aus 50 µl 2 M Tris/HCl, pH 8.1 und 50 µl 2 N HCl neutralisiert. Die Renaturation findet bei 65° C im Wasserbad statt. Jede Stunde wird eine 50-µl-Probe entnommen und zum Stoppen der Renaturation in 0.5 ml 0.14 M eiskühlten Natriumphosphatpuffer gegeben.

#### 4.6.2 Hydroxylapatitchromatographie

Über Hydroxylapatitchromatographie werden Einzel- und Doppelstränge, jeder während der Renaturation entnommenen Probe, getrennt. Als Trennsäulen verwendet man 2-ml-Einmalspritzen, die mit vorgequollenem Hydroxylapatit gefüllt werden. Die Säulen werden mit 0.14 M Natriumphosphatpuffer äquilibriert. Dann wird pro Säule eine Probe aufgetragen und zur Trennung der Einzelstränge dreimal mit 0.5 ml und einmal mit 1 ml 0.14 M Natriumphosphatpuffer, 0.4 % SDS eluiert. Das Eluat wird in Zählröhrchen aufgefangen und nach Zugabe von 1 ml 0.18 M Natriumphosphatpuffer, pH 6.8 und 10 ml Scintillator bei 4° C gezählt. Anschließend werden die Doppelstränge mit dreimal 0.5 ml 0.4 M Natriumphosphatpuffer, 0.4 % SDS eluiert und ebenfalls in Scintillationsgefäßen aufgefangen. Dazu gibt man 1.5 ml 0.4 % SDS, 1 ml H<sub>2</sub>O (bidest) und mißt wie schon bei den Einzelstrangproben bei 4° C die Radioaktivität der Doppelstränge.

#### 4.7 Reinigung von Restriktionsenzymen

Die Isolation der beiden Restriktionsenzyme Xho aus *Xanthomonas holcicola* und Xba aus *Xanthomonas badrii* wurde nach Gingeras et al., 1978 bzw. Zain und Roberts, 1977 durchgeführt.

Zunächst werden 33 g Bakterien bei 32° C in flüssigem NB angezogen, niedertourig zentrifugiert und in 50 ml Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 7.5, 10 mM Mercaptoäthanol) resuspendiert. Zum Aufbrechen werden die Bakterien fünfmal 2 Minuten Ultraschall behandelt. Dann wird 90 Minuten bei 40.000 Rpm zentrifugiert und der Überstand tropfenweise mit 60 ml einer Streptomycinsulfatlösung versetzt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt über 15 Minuten bei 12.000 Rpm wird der erhaltene Überstand 1:1 mit PC-Puffer verdünnt und anschließend gegen PC-Puffer dialysiert. Nach Dialyse eluiert man über eine Phosphozellulosesäule mit zweimal 150 ml eines 0 - 1 M KCl-Gradienten und fängt 35 Fraktionen zu je 120 Tropfen auf. Die Fraktionen werden mit  $\lambda$ -DNA auf Enzymaktivität getestet.

Fraktionen mit der Hauptenzymaktivität werden gepoolt und über DEAE-Zellulose gereinigt. Dazu wird mit einem 0 - 6 m KCl-Gradienten eluiert. Nach Austesten mit  $\lambda$ - und Adenovirus-DNA werden die aktiven Fraktionen gepoolt, mit 50% Glycerin versetzt und portionsweise bei  $-70^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

#### 4.8 Restriktionsanalyse

DNA läßt sich mit Restriktionsenzymen /Thomas und Davis, 1975/ in eine definierte Anzahl Fragmente spalten. Diese Fragmente werden über Agarosegelelektrophorese /Sharp et al., 1973/ aufgetrennt. Die so erhaltenen Fragmentmuster von DNA verschiedenen Ursprungs können dann untereinander verglichen werden.

##### 4.8.1 Spaltung von DNA

Die für die Spaltung einzusetzende DNA wird zunächst gegen TE-Puffer dialysiert. 4 - 6  $\mu\text{g}$  DNA werden dann mit 10  $\mu\text{l}$  Enzym, 5  $\mu\text{l}$  Spaltpuffer und soviel  $\text{H}_2\text{O}$  (bidest), daß der Ansatz 50  $\mu\text{l}$  umfaßt, versetzt und bei geeigneter Temperatur (Xho, Xba, Eco bei  $37^{\circ}\text{C}$ ; Sma bei  $25^{\circ}\text{C}$ ) 2 Stunden im Wasserbad inkubiert. Die optimale Enzymkonzentration wird zuvor über eine Enzymverdünnungsreihe bestimmt. Um das Probenvolumen möglichst klein zu halten, wird zehnfach konzentrierter Spaltpuffer verwendet. Nach 2 Stunden wird die Verdauung der DNA durch Hitzebehandlung (10 Minuten,  $70^{\circ}\text{C}$ ) und durch Zugabe von 5  $\mu\text{l}$  Stopp-lösung beendet und die Probe ins Eisbad gestellt. Für die anschließende Trennung der Fragmente über Gelelektrophorese werden dem Spaltungsansatz 5  $\mu\text{l}$  einer Lösung aus Sucrose und Bromphenolblau zugesetzt.

##### 4.8.2 Agarosegelelektrophorese

Die in dieser Arbeit verwendete Apparatur zur Gelelektrophorese wurde nach der Vorschrift von Dr. Blohm (GBF, Braunschweig-Stöckheim) in unserem Institut nachgebaut. Sie eignet sich für vertikale Gele.

Entsprechende Mengen Agarose (Gelkonzentration 0.7 - 1.2 %) werden in einfach konzentrierten Elektrophoresepuffer durch Kochen gelöst. Nach Abkühlen auf 60° C wird die Agaroselösung möglichst blasenfrei in die Elektrophoresekammer gegossen. Zur Bildung von Geltaschen wird in die noch flüssige Gelmischung ein Taschenformer eingesetzt, der nach Verfestigung der Agarose vorsichtig entfernt werden muß. In die Geltaschen füllt man mit einer 1-ml-Einmalspritze die DNA-Probe, die durch die zugesetzte Sucrose leicht unter den Elektrophoresepuffer unterschichtet werden kann. Durch Anlegen von 100 V Spannung an die Elektrophoresekammer läßt man die aufgetragene DNA-Probe zunächst 5 Minuten in das Agarosegel einwandern. Dann schaltet man auf 20 V zurück und läßt die Elektrophorese so lange laufen (~ 22 Stunden) bis das zugesetzte Bromphenolblau aus dem Gel verschwunden ist. Zur Verhinderung von Diffusionseinflüssen führt man die Elektrophorese bei 4° C durch.

#### 4.8.3 Auswertung der Gele

Nach beendeter Elektrophorese wird das Gel mit einer EtBR-Lösung (1 µg/ml) 30 Minuten gefärbt und im UV-Durchlicht (254 nm, Transilluminator von Hormuth und Vetter) photographiert (Polaroid-Land Kamera MP4, Polaroidfilm Typ 105, Orangefilter, Belichtungszeit 2 - 3 Minuten).

#### 4.9 Darstellung von Plasmid-DNA im Elektronenmikroskop

Die Plasmid-DNA aus dem CsCl-EtBR-Gradienten wird bei der von mir angewandten Droplet-Methode /Lang und Mitani, 1970/ sowie der Spreitung /Davis et al., 1971/ ohne vorheriges Entfärben oder Dialyse verwendet. Die Spreitung von DNA eignet sich besonders zur Molekulargewichtsbestimmung von großen Plasmiden. Um die Plasmide in der oc-Form zu erhalten, läßt man sie einige Stunden am Tageslicht stehen. So entstehen Einzelstrangbrüche, die aus der ursprünglichen ccc-Form die oc-Form machen.

#### 4.9.1 Droplet-Methode

Bei dieser Methode geht man von folgender Stammlösung aus: 2.56 ml  $H_2O$  (bidest), 0.3 ml 2 M  $CH_3COONH_4$ , 1 mM EDTA, 0.08 ml 0.01% Cytochrom C. 0.25 ml dieser Lösung werden mit 1 - 5 ul Plasmid-DNA versetzt. Von dieser Mischung setzt man mit einer Pipette Tropfen auf eine hydrophobe Oberfläche (Plastik-Petrischale). Nach einer halben Stunde nimmt man den zur Tropfenoberfläche diffundierten Cytochrom-C-Film vorsichtig mit einem Parlodion beschichteten Kupfernetz ab. Das Kupfernetz wird zum Positivkontrastieren der DNA 30 sec in eine Uranylacetatlösung getaucht, 10 sec in 90% Äthanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Anschließend wird mit Pt-Ir rotationsbedampft (Bedampfungsanlage Jeol JEE4B, Japan; Bedampfungszeit 1 Minute, Spannung 30 V, Bedampfungswinkel  $6^\circ$ , Abstand 4,5 cm). Zur Stabilisierung der Proben wird noch kurz Kohle bedampft (Bedampfungszeit 1 sec, Spannung 30 V).

#### 4.9.2 Spreitung von DNA

Zunächst werden 5 - 10 ul Plasmid DNA mit 10 ul Spreitungslösung und 0.5 ul Cytochrom C (5 mg/ml) versetzt. 5 ul dieser Mischung (Oberphase) läßt man dann über eine schiefe Ebene aus zwei Glaskapillaren auf eine Flüssigkeitsoberfläche (Unterphase), die aus 10% Formamid, 1 mM Tris, pH 8.5 und 1 mM EDTA besteht, fließen. Der Cytochrom-DNA-Film breitet sich auf dieser Unterphase aus. Nach etwa 30 sec nimmt man den Film mit einem Parlodion beschichteten Kupfernetz von der Unterphase ab. Die Kupfernetze werden dann, wie bei der Droplet-Methode bereits beschrieben, mit Uranylacetat positivkontrastiert und mit Pt-Ir bedampft.

#### 4.9.3 Längenmessung von Plasmid-DNA

Die Konturlänge, der im Elektronenmikroskop photographierten Plasmide, wird mithilfe eines Längenmeßgerätes vom Positiv bestimmt. Für die Längenmessung kann man einen bei derselben

Vergrößerung wie die Plasmide photographierten Gitterstandard verwenden. Es ist aber auch möglich, der auszumessenden Plasmidfraktion, kleine DNA-Ringe mit bekannter Länge wie Col E1 oder PMB9 zuzusetzen. Durch Vergleich der Konturlänge von internem Standard (Col E1, PMB9) und der zu bestimmenden Plasmide ergibt sich die exakte Länge der Plasmide.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 GC-Gehalt und Heterogenität von Rhizobium-Segreganten

Zur Klassifizierung der zu untersuchenden Rhizobium-Segreganten wurden Schmelzanalysen ihrer DNA (vgl. S. 12) durchgeführt. Aus diesen Schmelzanalysen läßt sich der GC-Gehalt der DNA bestimmen. Das Prinzip dieser Methode soll im folgenden kurz dargestellt werden. Denaturiert man DNA durch Hitze, so ändert sich mit zunehmender Temperatur als gut meßbare Größe ihre optische Dichte, da die geordnete Doppelhelixstruktur eine um 40% geringere UV-Absorption zeigt, als der ungeordnete Knäuelzustand des Einzelstrangmoleküls /Hirschmann und Felsenfeld, 1966/. Die Änderung der optischen Dichte bezeichnet man als Schmelzkurve. Je nach Verlauf unterscheidet man unimodale bzw. multimodale Kurven /Mandel und Marmur, 1968/. Unimodale Schmelzkurven sind symmetrisch und haben einen einzigen Wendepunkt, bimodale Kurven weisen zwei, trimodale drei Wendepunkte auf. Die Wendepunkte heißen Schmelzpunkte  $T_m$  und lassen sich graphisch bestimmen. Aus der Beziehung /Mandel und Marmur, 1968/

$$GC = 2.44 (T_m - 81.5 - 16.6 \cdot 10^3 \log M) \quad (1)$$

läßt sich dann bei bekannter Molarität ( $M = 0.01 - 0.02$ ) an  $Na^+$ - oder  $K^+$ -Ionen der GC-Gehalt der Probe ermitteln. Dabei wird der Schmelzpunkt in  $^{\circ}C$  und der GC-Gehalt in % angegeben.

Die Steilheit des Anstiegs der Schmelzkurve gibt einen Hinweis auf die Heterogenität der DNA /Mandel und Marmur, 1968/. Als Maß für diese Steilheit nimmt man das Temperaturintervall

$\Delta T_{2/3}$ , in dem  $2/3$  des Anstiegs der optischen Dichte erfolgt. Die Heterogenität  $\sigma$  ergibt sich dann aus der Beziehung /Mandel und Marmur, 1968/

$$\sigma = (\Delta T_{2/3} - 3.0) \cdot 1.22 \quad (2)$$

Bei der Aufstellung dieser Formel wurde berücksichtigt, daß sich für poly d-AT ( $\Delta T_{2/3} = 3.0^{\circ} \text{C}$ ) die Heterogenität  $\sigma = 0$  ergeben muß.

Es ist genauer, statt mit Beziehung (1), mit einer Referenz-DNA von bekanntem Schmelzpunkt zu arbeiten. Wir haben dazu *Escherichia coli*-DNA verwendet. Der GC-Gehalt unserer DNA ergibt sich dann nach Gleichung (1) wie folgt:

$$\text{GC} = 2.44 (T_m - T_{m \text{ E.coli}}) \quad (3)$$

$$\text{GC} = \text{GC}_{\text{E.coli}} + \Delta \text{GC} \quad (4)$$

Die so bestimmten  $T_m$ -Werte ließen sich gut reproduzieren. Das gilt sowohl für ein und dieselbe Probe als auch für Proben verschiedener Präparationen. Die Meßgenauigkeit lag im Rahmen des in der Literatur /Marmur und Doty, 1962/angegebenen Bereichs.

DNA aus verschiedenen *Rhizobium*-Segreganten zeigte im wesentlichen einen unimodalen d.h. symmetrischen Kurvenverlauf. Stellvertretend für alle übrigen Stämme sind in Abb.1 zwei typische Kurven dargestellt. Man sieht, daß die Schmelzkurve der nif-Typ-Segregante 3o-14 (vgl. Abb.1, S. 23) im Gegensatz zur car-Typ-Segregante 1-34 (vgl. Abb. 1, S.23) im unteren Teil einen etwas asymmetrischen Verlauf erkennen läßt. Die Ursache für diese Abweichung könnte in extrachromosomaler DNA anderen GC-Gehalts zu suchen sein (vgl. S. 28). Die von uns untersuchten nif-Typ-Segreganten 3o-1, 3o-13 und 3o-14 hatten einen einheitlichen GC-Gehalt von 64% (vgl. Tabelle 2, S. 24). Die car-Typ-Segreganten 1-34, 1-924 und 1-925d (vgl. Tabelle 2, S. 24) lagen etwa um 4% höher als die nif-Typ-Segreganten, während die min-Typ-Segregante 1-925a nur 59% GC-Gehalt aufwies (vgl. Tabelle 2, S. 24).

In der Heterogenität  $\sigma$  (vgl. Tabelle 2, S. 24) des GC-Gehalts von nif-Typ- und car-Typ-Segreganten zeigten sich gering-

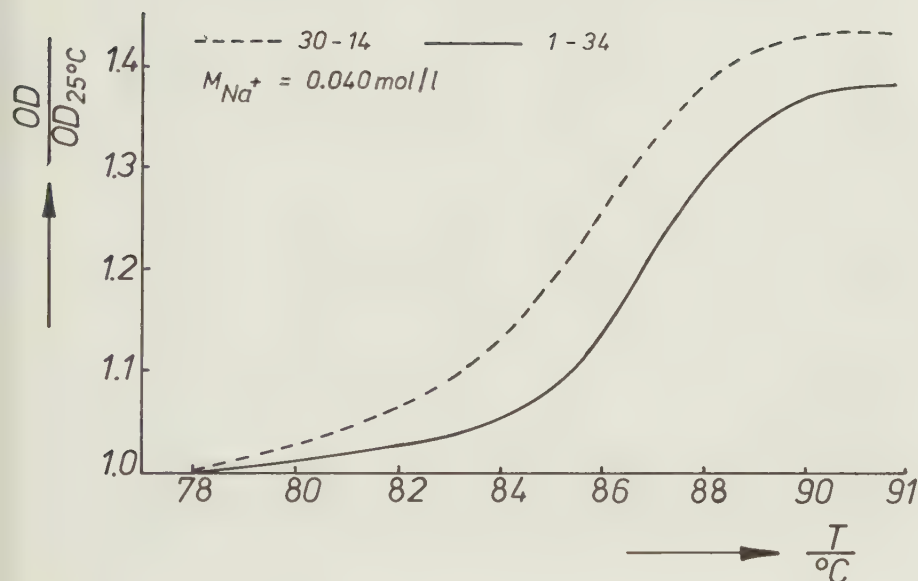


Abb. 1: Schmelzkurven von DNA der Rhizobium-Segreganten  
nif-Typ 30-14 und car-Typ 1-34

fügte Unterschiede. Die car-Typ-Segreganten wiesen die geringste Heterogenität auf, die nif-Typ-Segregante 30-14 etwas höhere. Dies war zusätzlich zur oben bereits erwähnten leichten Asymmetrie in der Schmelzkurve beispielsweise von 30-14 ein Hinweis darauf, daß die DNA dieser Stämme aus Regionen verschiedenen mittleren GC-Gehalts bestehen könnte, die jedoch so eng im GC-Gehalt beieinanderliegen, daß sie noch nicht zu einem deutlich sichtbaren bimodalen Verlauf führen. Deshalb wurden einige Stämme auch noch auf ihre Dichte  $\rho$  in CsCl in der analytischen Ultrazentrifuge untersucht.

| Rhizobium-Segreganten | T <sub>m</sub> (°C) | GC(%)     | $\Delta T_{2/3}$ (°C) | $\sigma$ (%GC) |
|-----------------------|---------------------|-----------|-----------------------|----------------|
| nif-Typ               |                     |           |                       |                |
| 30-1                  | 85.2                | 64.7      | 4.4                   | 1.7            |
| 30-13                 | 85.0                | 63.8      | 5.0                   | 2.4            |
| 30-14                 | 85.2                | 64.5      | 5.1                   | 2.6            |
| car-Typ               |                     |           |                       |                |
| 1-34                  | 86.4                | 67.7      | 3.8                   | 0.9            |
| 1-924                 | 86.6                | 68.2      | 3.6                   | 0.7            |
| 1-925d                | 86.4                | 68.0      | 4.0                   | 1.2            |
| min-Typ               |                     |           |                       |                |
| 1-925a                | 83.0                | 59.1      | 3.45                  | 0.5            |
| experimenteller       |                     |           |                       |                |
| Fehler                | $\pm 0.2$           | $\pm 0.5$ | $\pm 0.2$             | $\pm 0.2$      |

Tabelle 2: GC-Gehalt und Heterogenität von Rhizobium-Segreganten

## 5.2 DNA-Dichte von Rhizobium-Stämmen und ihren Segreganten gemessen im CsCl-Gradienten

Zur Bestimmung der Dichte (vgl. S. 12) von WT-, nif-Typ-, car-Typ- und min-Typ-DNA wurden Rohlysate der Zellen über 20 Stunden in der analytischen Ultrazentrifuge zentrifugiert. Dabei erhielt man deutlich verschiedene Dichteprofile. WT-, car-Typ- und min-Typ-DNA zeigten einen symmetrischen, scharfen Gipfel, während DNA des nif-Typs eine deutliche Schulter bei geringer Dichte aufwies. Hauptgipfel und Schulter ließen sich aber durch starkes Scheren der DNA in zwei Gipfel unterschiedlicher Größe trennen. Abb. 2 zeigt diese Gipfel am Beispiel von 30-14. Dieser Befund bestätigt die bereits in den Schmelzkurven aufgetretene Asymmetrie und könnte ein Hinweis auf Plasmid-DNA geringerer Dichte sein (vgl. Tab. 3, S. 26).

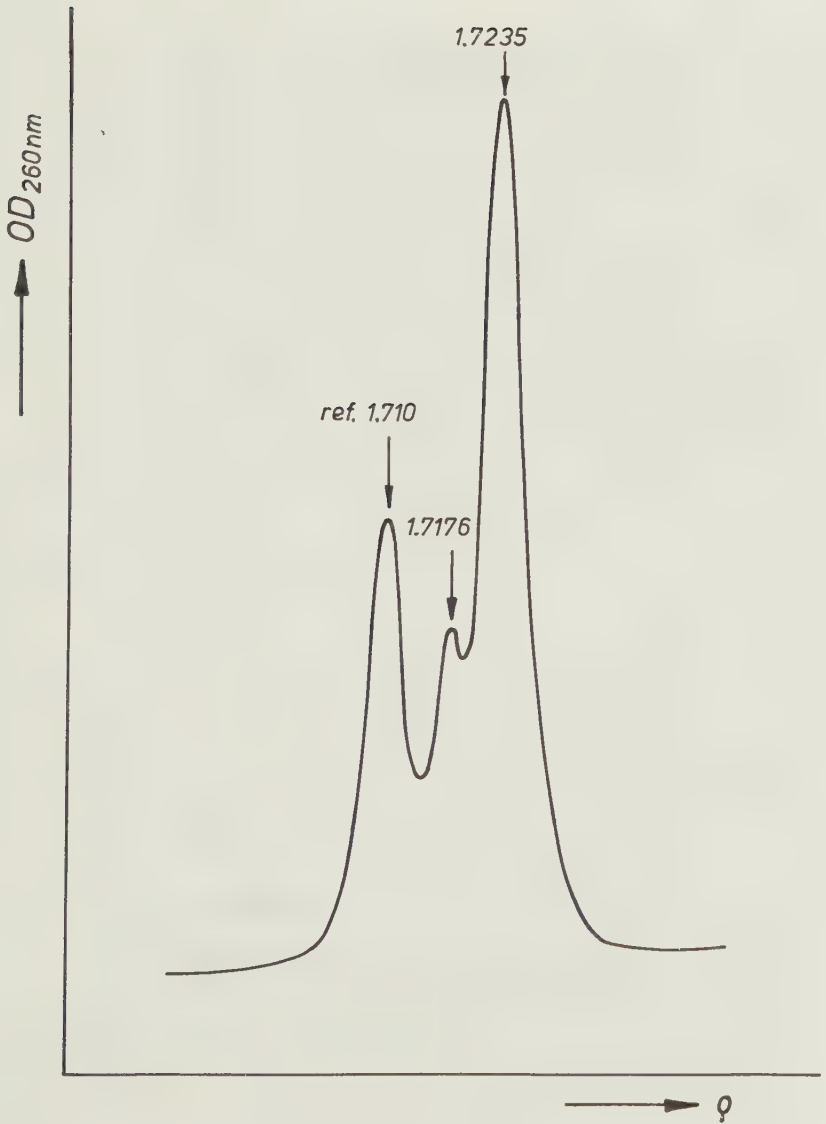


Abb. 2: Dichteprofil von DNA aus der nif-Typ-Segregante  
3o-14

| WT-Rhizobien                 | $\rho$ (g/cm <sup>3</sup> ) | GC(%)        |
|------------------------------|-----------------------------|--------------|
| R. meliloti                  | 1.722<br>(1.717)            | 62.6<br>57.5 |
| R. trifolii                  | 1.720<br>(1.717)            | 60.6<br>57.5 |
| <u>Rhizobium-Segreganten</u> |                             |              |
| nif-Typ                      |                             |              |
| 30-1                         | 1.723<br>(1.717)            | 63.7<br>57.5 |
| 30-13                        | 1.723<br>(1.717)            | 63.7<br>57.5 |
| 30-14                        | 1.723<br>(1.717)            | 63.7<br>57.5 |
| car-Typ                      |                             |              |
| 1-34                         | 1.725                       | 65.8         |
| 1-44                         | 1.725                       | 65.8         |
| 1-925d                       | 1.725                       | 65.8         |
| 1-926                        | 1.725                       | 65.8         |
| min-Typ                      |                             |              |
| 1-925a                       | 1.717                       | 58.5         |
| experimenteller              |                             |              |
| Fehler                       | $\pm 0.0005$                | $\pm 0.5$    |

Tabelle 3: Dichte  $\rho$  und GC-Gehalt von WT-Rhizobien und Rhizobium-Segreganten  
Werte in ( ) = Dichten extrachromosomaler DNA

Die einheitliche Dichte und die daraus berechneten GC-Werte der WT-Rhizobien sowie der car-Typ- und min-Typ-Segreganten sind in Tabelle 3, S. 26 angegeben. In den beiden WT-Rhizobien *Rhizobium meliloti* 20-26 und *R. trifolii* 30141 wurden allerdings auch Plasmide der Dichte  $\rho = 1.717 \text{ g/cm}^3$  gefunden /Spitzbarth et al., 1979 im Druck/ (vgl. S. 26), die sich aber über analytische Ultrazentrifugation nicht auflösen ließen. In die Tabelle 3, S. 26 wurden nur einige wenige für weitere Untersuchungen interessante Rhizobien aufgenommen. Insgesamt wurden über 60 Stämme gemessen. Da die erhaltenen Werte jedoch einerseits mit Literaturwerten für Rhizobien /Gibbins und Gregory, 1972/ und andererseits im Falle von Segreganten im Rahmen der Werte der Tabelle 3 lagen, wurde auf eine Wiedergabe sämtlicher Werte an dieser Stelle verzichtet.

Bei der Rechnung selbst wurde die Beziehung /De Ley, 1970/

$$\text{GC} = (\rho - 1.6616) \cdot 1.038 \quad (5)$$

verwendet. Dabei wird der GC-Gehalt in % und die Dichte  $\rho$  in  $\text{g/cm}^3$  angegeben. Die so bestimmten GC-Werte stimmen gut mit aus Schmelzkurven gewonnenen überein (vgl. Tabelle 2, S.24). Die Abweichung beträgt etwa 1% und liegt damit im Bereich des experimentellen Fehlers bzw. im Bereich der Unsicherheit mit der die Gleichung (1) ermittelt wurde /De Ley, 1970/.

### 5.3 Extrachromosomale DNA in *Rhizobium*-Stämmen und ihren Segreganten

Wir wollen in diesem Abschnitt nun der Frage nachgehen, in welcher Form in den nif-Typ-Segreganten DNA der Dichte  $\rho = 1.717 \text{ g/cm}^3$  (vgl. Abb. 2, S. 25) vorliegt. Die Vermutung liegt nahe, daß es sich um Plasmid-DNA handelt. Für den Vergleich dieser Plasmid-DNA mit Plasmid-DNA aus WT-Rhizobien wurde zunächst versucht aus dem *Rhizobium trifolii*-Stamm 30141 und der nif-Typ-Segregante 30-14 über CsCl-EtBR-Dichtegradientenzentrifugation Plasmide zu isolieren. Nach Zentrifugation wurden in

beiden Fällen zwei im UV-Licht sichtbare Banden erhalten, eine relativ dicke, chromosomale und eine darunterliegende schwächere Bande. Diese zweite Bande wurde vorsichtig aus dem Gradienten abgezogen und zur elektronenmikroskopischen Analyse präpariert (vgl. S. 19). Im Elektronenmikroskop fanden wir tatsächlich Plasmide. Zur Charakterisierung dieser Moleküle wurde zunächst ihre Länge gemessen. Im R.trifolii-Stamm 3o141 fanden wir Plasmide mit einer Länge zwischen 80 um und 95 um (vgl. Abb. 3, S. 29). In der nif-Typ-Segregante 3o-14 gab es im wesentlichen drei Größenklassen von Plasmiden. Sehr große Plasmide mit einer Länge von 80 - 110 um (vgl. Abb. 4, S. 3o) waren am häufigsten, seltener traten mittlere DNA-Ringe von 12 - 15 um (vgl. Abb. 5a, S.31) und vereinzelt kleine von 5 um auf (vgl. Abb. 5b, S.31). Auch in den beiden anderen nif-Typ-Segreganten 3o-1 und 3o-13 konnten über CsCl-EtBR-Dichtegradientenzentrifugation Plasmide gleicher Größenklassen nachgewiesen werden.

Genauso wurde in den car-Typ-Segreganten 1-924, 1-925d und 1-926 sowie der min-Typ-Segregante 1-925a nach Plasmiden gesucht. Man findet nämlich oft, daß chromosomale und Plasmid-DNA dieselben oder eng beieinanderliegende Dichten besitzen (vgl. Tabelle 2, S. 26) und sich deshalb durch Schmelzanalysen und über analytische Ultrazentrifugation nicht auflösen lassen. Das Ergebnis war in diesem Falle allerdings negativ.

Auf Grund der sehr ähnlichen Größe und der einheitlichen Dichte  $\rho = 1.717 \text{ g/cm}^3$  der untersuchten Plasmide, kann die Vermutung aufkommen, daß diese Plasmide ein gemeinsames Merkmal aller Rhizobien darstellen und möglicherweise in ihrem Aufbau sehr ähnlich sind. Zur Untersuchung dieser Frage haben wir aus den WT-Stämmen Rhizobium meliloti 2o11, R.leguminosarum 3oo, R.trifolii 3o141 und der nif-Typ-Segregante 3o-14 Plasmid-DNA isoliert und mit den Restriktionsenzymen EcoRI und Sma gespalten (vgl. S. 17). Aus den über Agarosegelelektrophorese (vgl. S. 17) erhaltenen Spaltmustern lassen sich



Abb. 31 Große Plasmid-DNA aus dem *Rhizobium trifolii* Stamm 30141  
Vergrößerung 35.000-fach

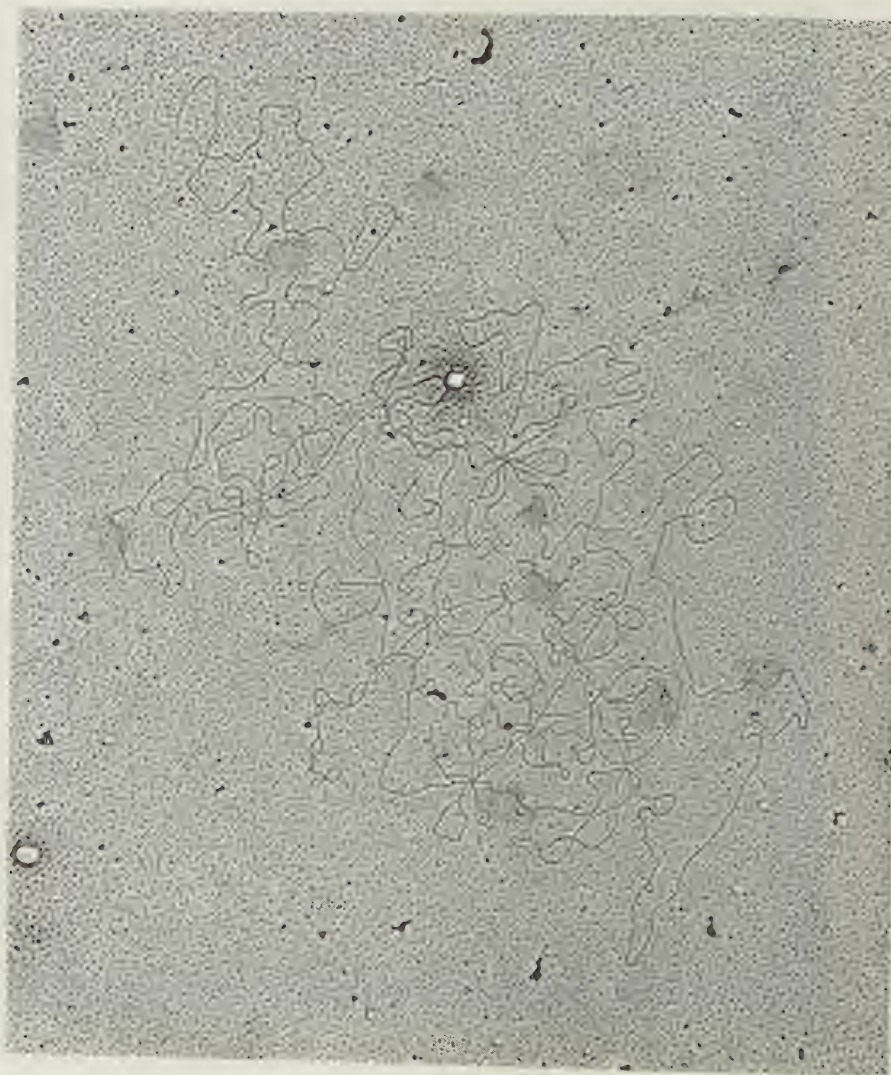


Abb. 4: Größere Plasmid-DNA aus der nif-Typ-Segregante 30-14  
Vergrößerung 35.000-fach

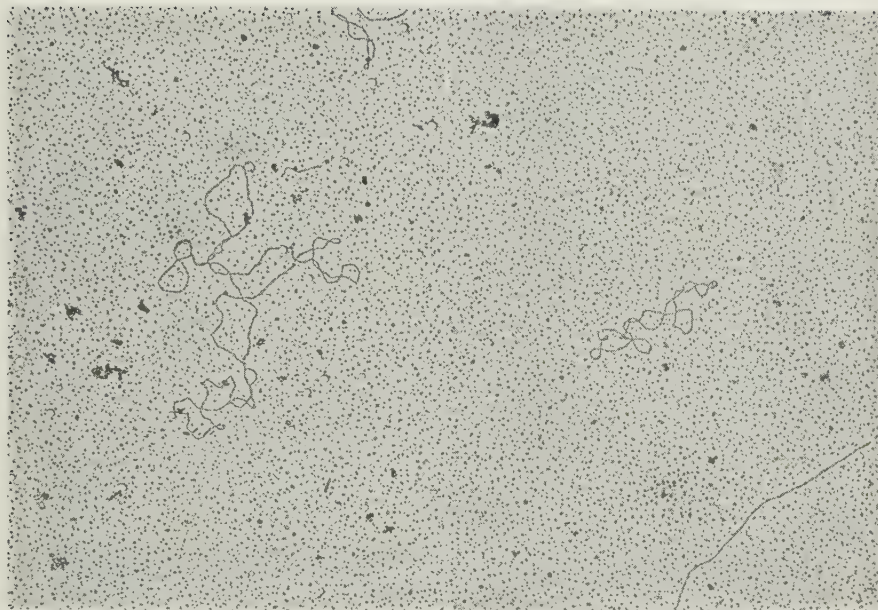


Abb. 5a, b: Mittlere und kleinere Plasmid-DNA aus der nif-Typ-  
Segregante 3o-14  
Vergrößerung 35.000-fach

dann Rückschlüsse auf den Grad der Verwandtschaft ziehen. Allerdings erhielten wir aufgrund der Größe der Plasmide in allen Fällen eine sehr hohe Zahl von Spaltstellen. Eine detaillierte Auswertung ist deshalb schwierig. Man kann aber sagen, daß die verschiedenen Plasmide keine erkennbare Ähnlichkeit im Spaltmuster aufweisen, obwohl sie etwa die gleiche Länge und vor allem die gleiche Dichte haben.

#### 5.4 In vitro-Markierung und Filterhybridisierung der DNA von Rhizobium-Stämmen und ihren Segreganten

Nach der Untersuchung der extrachromosomalen DNA von Rhizobien kommen wir in diesem Abschnitt wieder auf die chromosomale DNA zurück, deren Dichte bzw. GC-Gehalt wir bereits für viele Stämme bestimmt haben (vgl. Tabelle 2, S. 24 und Tabelle 3, S. 26). Zum Vergleich der Rhizobien untereinander, das haben die Plasmid-Analysen recht deutlich gezeigt, reicht allerdings die Messung des GC-Gehalts nicht aus. Dagegen stellt die Methode der Filterhybridisierung (vgl. S. 13) eine relativ einfache Methode dar, Verwandtschaftsgrade d.h. Homologie verschiedener DNA-Moleküle direkt zu bestimmen. Dazu muß eine beteiligte DNA radioaktiv markiert werden. Zunächst soll das Prinzip dieser Methode noch einmal kurz erläutert werden (vgl. S. 13). Läßt man DNase I auf doppelsträngige DNA einwirken, so entstehen statistisch verteilte Einzelstrangbrüche. Diese Bruchstellen werden durch Kornberg-Polymerase vergrößert (Exonucleaseaktivität). Die entstandenen Lücken werden dann durch Einbau von  $^3\text{H}$ -Thymidin und den übrigen "kalten" Nukleotidtriphosphaten gemäß der Paarungshomologie wieder geschlossen (Polymeraseaktivität). Das Ausmaß der radioaktiven Markierung richtet sich demnach hauptsächlich nach der Dauer der DNase-Einwirkung.

DNA verschiedener WT-Rhizobien (*Rhizobium meliloti* 2o-26, *R. leguminosarum* LVII-1, *R. lupini* Wu 425, *R. japonicum* 18o9) und der Rhizobium-Segreganten nif-Typ 3o-14 und car-Typ 1-34 wurde auf diese Weise für spätere Hybridisierungsversuche mit  $^3\text{H}$ -Thymidin markiert. Wie auf S. 13 geschildert, trägt man zur Kontrolle des Einbaus und zur Isolierung der "heißen" DNA die gemessene Radioaktivität der einzelnen Fraktionen graphisch auf. Abb. 6 zeigt eine entsprechende Darstellung für den *Rhizobium meliloti*-Stamm 2o-26. Gipfel 1 enthält radioaktive DNA, Gipfel 2 die nicht eingebauten Triphosphate. Der jeweils erreichte Einbau an Radioaktivität/ug eingesetzter DNA kann der Tabelle 4 entnommen werden.

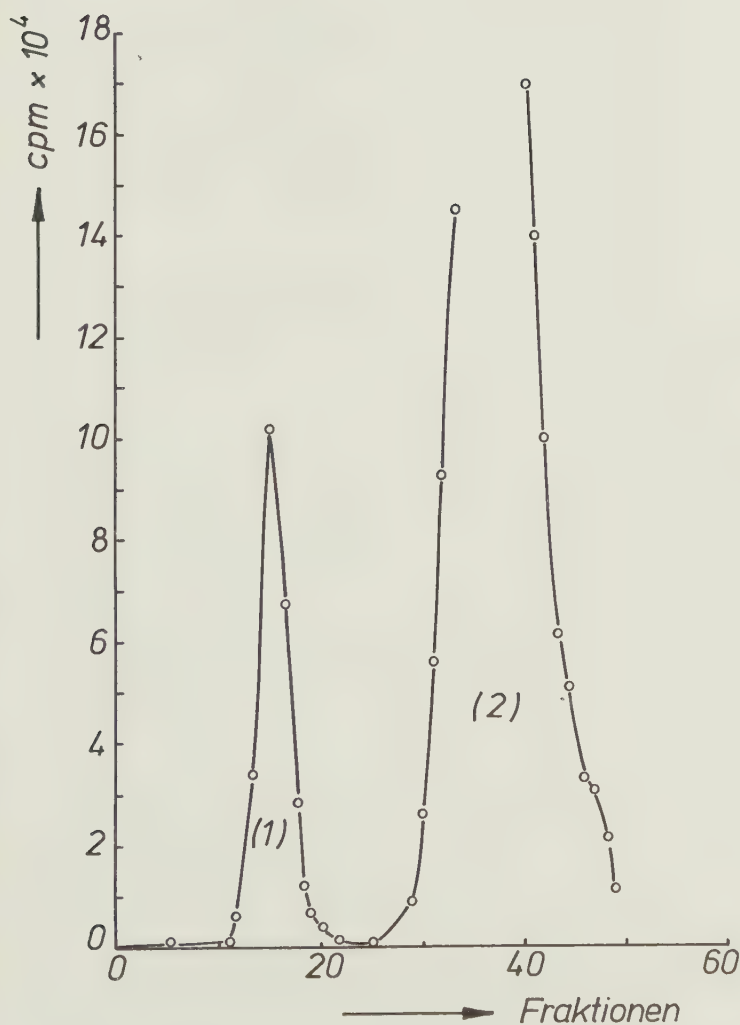


Abb. 6: Trennung von unverbrauchtem  $^3\text{H}$ -Thymidin (2) von markierter *Rhizobium meliloti* 20-26-DNA (1) über Sephadex G 50

| <u>WT-Rhizobien</u>          | <u>cpm/ug</u>    |
|------------------------------|------------------|
| R.meliloti 2o-26             | $2 \cdot 10^6$   |
| R.leguminosarum LVII-1       | $1,9 \cdot 10^5$ |
| R.lupini Wu425               | $2 \cdot 10^6$   |
| R.japonicum CB18o9           | $4 \cdot 10^6$   |
| <u>Rhizobium-Segreganten</u> |                  |
| nif-Typ 3o-14                | $2,2 \cdot 10^6$ |
| car-Typ 1-34                 | $1 \cdot 10^6$   |

Tabelle 4: Radioaktivität in cpm pro ug eingesetzte DNA  
cpm = counts per minute

Zur Filterhybridisierung selbst (vgl. S. 13) wird gereinigte Rhizobium-DNA alkalisch denaturiert und vorsichtig auf Nitrozellulosefilter gesaugt. Die Filter werden getrocknet, mit einer entsprechenden Lösung aus  $^3\text{H}$ -Thymidin markierter DNA überschichtet und bei  $65^\circ\text{C}$  im Wasserbad zur Renaturierung 2o Stunden inkubiert. Dabei lagern sich komplementäre DNA-Stränge zusammen. Nach beendeter Reaktion werden die Filter gewaschen, in Toluolscintillator aufgelöst und ihre Radioaktivität gemessen.

Auf diese Weise untersuchten wir DNA aus dem WT-Stamm R.meliloti 2o-26, den nif-Typ-Segreganten 3o-1 und 3o-14 und den car-Typ-Segreganten 1-34 und 1-44 auf Basenhomologie. Als Maß für die Verwandtschaft der einzelnen Stämme untereinander wird die relative Hybridisierungsrate angegeben. Um sie zu berechnen, setzt man die Selbsthybridisierungsrate der positiven Kontrolle 100% und bezieht alle übrigen Werte darauf. Die absolute Selbsthybridisierung der positiven Kontrolle betrug dabei etwa 30% der eingesetzten Radioaktivität. Die relativen Hybridisierungswerte der untersuchten Stämme sind in Tabelle 5 dargestellt. Die markierte DNA wurde jeweils mit\* versehen.

| <u>Rhizobium-Stämme</u>    | <u>Hybridisierung in %</u> |
|----------------------------|----------------------------|
| R.meliloti 2o-26 *         | 100                        |
| Segregante nif-Typ 3o-14   | 14                         |
| Segregante car-Typ 1-34    | 12                         |
| Segregante nif-Typ 3o-14 * | 100                        |
| Segregante nif-Typ 3o-1    | 77                         |
| Segregante car-Typ 1-34    | 17                         |
| Segregante car-Typ 1-34 *  | 100                        |
| Segregante car-Typ 1-44    | 65                         |

Tabelle 5: Relative Hybridisierungsraten von WT-Rhizobien und Rhizobium-Segreganten

Die in Tabelle 5 erhaltenen Ergebnisse können in folgender Weise zusammengefaßt werden:

1. Rhizobium meliloti 2o-26 zeigt mit den beiden Rhizobium-Segreganten nif-Typ 3o-14 und car-Typ 1-34 geringe Basenhomologie.
2. Die beiden nif-Typ-Segreganten 3o-1 und 3o-14 zeigen untereinander große Verwandtschaft. Wahrscheinlich sind weite Bereiche ihrer DNA sogar identisch. Die nif-Typ-Segregante und die car-Typ-Segregante 1-34 weisen jedoch nur geringe Basenhomologie auf.
3. Die beiden car-Typ-Segreganten 1-34 und 1-44 sind immer noch sehr verwandt.

Mit Hilfe der Filterhybridisierung können also, im Gegensatz zur bloßen Bestimmung des GC-Gehalts, bereits relativ detaillierte Aussagen über den Verwandtschaftsgrad verschiedener Rhizobien gemacht werden. Allerdings ist die Methode wegen der relativ geringen absoluten Selbsthybridisierung von etwa 30% verhältnismäßig ungenau. Darüberhinaus kann das zeitliche Verhalten der Renaturierung nicht erfaßt werden. Wir haben deshalb für alle weiteren Untersuchungen zur Basen-

homologie die Kinetik der Renaturierung untersucht, die gegenüber der Filterhybridisierung drei wesentliche Vorteile aufweist:

1. Aufgrund der etwa viermal höheren Selbsthybridisierung ist auch die Auflösung viermal besser.
2. Durch das Registrieren des zeitlichen Ablaufs der Renaturierung kann das Erreichen des Sättigungswertes genau erfaßt werden.
3. Nach Erreichen der Sättigung können im zeitlichen Abstand verschiedene Proben entnommen werden und die für sie erhaltenen Hybridisierungswerte gemittelt werden.

## 5.5 Reassoziaton von Rhizobium-Stämmen und ihren Segreganten

### 5.5.1 Prinzip der Methode

Gereinigte lyophilisierte DNA und die entsprechende radioaktive DNA werden durch Kochen und Alkalibehandlung denaturiert. Nach der Neutralisation läßt man die einsträngige DNA bei geeigneter Temperatur ( $20 - 25^{\circ}\text{C}$  unter dem Schmelzpunkt der DNA) wieder renaturieren. In bestimmten Zeitabständen entnimmt man eine Probe aus dem Reassoziationsansatz und mißt nach Trennung von Einzel- und Doppelsträngen den jeweiligen Hybridisierungsgrad.

### 5.5.2 Theorie

Die Renaturierung denaturierter DNA in Anwesenheit von  $^3\text{H}$ -Thymin markierter DNA folgt formal einer Kinetik 2.Ordnung. Die Gesamtreaktion läßt sich jedoch in eine langsam ablaufende 2.Ordnung und eine schnell ablaufende 1.Ordnung gliedern. Zunächst paaren sich Einzelstränge über einzelne Basen, im zweiten Reaktionsschritt schließen sich dann die entstandenen "loops". Mathematisch läßt sich die Kinetik durch folgenden Ansatz beschreiben:

$$\frac{dc}{dt} = -k \cdot c^2 \quad (6)$$

Die Lösung der Gleichung lautet:

$$\frac{c_0}{c_t} = k \cdot t \cdot c_0 + 1 \quad (7)$$

c Konzentration radioaktiver Einzelstränge

k Geschwindigkeitskonstante

Die Geschwindigkeitskonstante und somit die Renaturierungsgeschwindigkeit hängt von folgenden Faktoren ab / Wetmur und Davidson, 1968/.

1. Sie erreicht 20 - 30° C unter dem Schmelzpunkt  $T_m$  einer DNA ein Maximum.
2. Sie ist umgekehrt proportional zur Viskosität, d.h. zur Konzentration einer DNA-Lösung.
3. Sie hängt von der Größe der DNA-Fragmente ab, d.h. vom Ausmaß der DNA-Scherung.
4. Sie nimmt mit steigendem GC-Gehalt zu.
5. Sie ist umso geringer, je komplexer die DNA ist, d.h. je weniger repetitive Sequenzen sie hat.
6. Sie ist oberhalb von 0.4 mol/l unabhängig von der  $Na^+$ -Ionenkonzentration.

Bei der Durchführung der Reassoziationskinetiken haben wir versucht, durch Optimieren der geschilderten Bedingungen, eine möglichst hohe und einheitliche Reaktionsgeschwindigkeit für alle Rhizobium-Stämme zu erreichen.

### 5.5.3 Hybridisierungsrate

In Abb. 7 - 12 sind die Ergebnisse der Hybridisierungsexperimente graphisch dargestellt. Dazu ist jeweils die Hybridisierungsrate

$$H = \left( 1 - \frac{c_t}{c_0} \right) \cdot 100\% \quad (8)$$

gegen die Zeit t aufgetragen. Wie in Formel (7) ist  $c_0$  bzw.  $c_t$  die Konzentration der radioaktiven Einzelstränge zur Zeit t = 0 bzw. zur Zeit t. Die Bedeutung der Größe H als Hybridisierungsrate wird klar, wenn man bedenkt, daß sich für t = 0

$H = 0$  ergibt. Andererseits erhält man  $H = 100\%$ , wenn die Konzentration der Einzelstränge  $c_t$  verschwindet. Wir wollen nun die Abbildungen 7 - 12 im einzelnen besprechen.

Abb. 7a/b zeigt die Reassoziaton von "heißer" nif-Typ-DNA aus 3o-14 mit DNA aus *Rhizobium meliloti* 2o-26, aus den nif-Typ-Segreganten 3o-1 und 3o-13, aus den car-Typ-Segreganten 1-924 und 1-926 und aus der min-Typ-Segregante 1-925a. Wegen der Vielzahl dieser Stämme mußten zwei getrennte Hybridisierungsversuche durchgeführt werden, die in den beiden Teilabbildungen 7a und 7b auch getrennt aufgeführt sind. Man erkennt, daß die positive Kontrolle beide Male auf etwa denselben Wert von 7o% in der Sättigung führt. Es fällt auf, daß der Stamm 3o-13 sogar einen höheren Wert als die positive Kontrolle zeigt. Es ist natürlich nicht möglich, daß dieser Stamm mit 3o-14 tatsächlich eine höhere Basenhomologie aufweist als eine Selbsthybridisierung. Es zeigt sich in diesem Punkt vielmehr, wie auch bei der Schwankung der Sättigungswerte, daß die Methode offensichtlich einen Fehler von 5% aufweist. Weiter erkennt man bei genauer Betrachtung, daß der Sättigungswert der Selbsthybridisierung im ersten Versuch etwas später erreicht wird als im zweiten. Dies kann auf Schwankungen der Wasserbadtemperatur während der Renaturierung zurückgeführt werden. Als negative Kontrolle wurde beide Male *Escherichia coli*-DNA verwendet. Da sich immer ein Sättigungswert von 3 - 5% ergab, wurden aber in der zweiten Teilabbildung der Übersicht halber die *E.coli*-Werte weggelassen.

Als wesentliches Ergebnis zeigen diese beiden Versuche einmal, daß die nif-Typ-Segregante 3o-14 mit dem WT-Stamm *R.meliloti* 2o-26 nur eine sehr geringe Verwandtschaft hat. Zum anderen zeigt 3o-14 mit den beiden nif-Typ-Segreganten 3o-1 und 3o-13 sehr hohe Basenhomologie. Diese Basenhomologie ist noch ausgeprägter als die Filterhybridisierung vermuten läßt (vgl. Tabelle 5, S.35). Mit den *Rhizobium*-Segreganten car-Typ

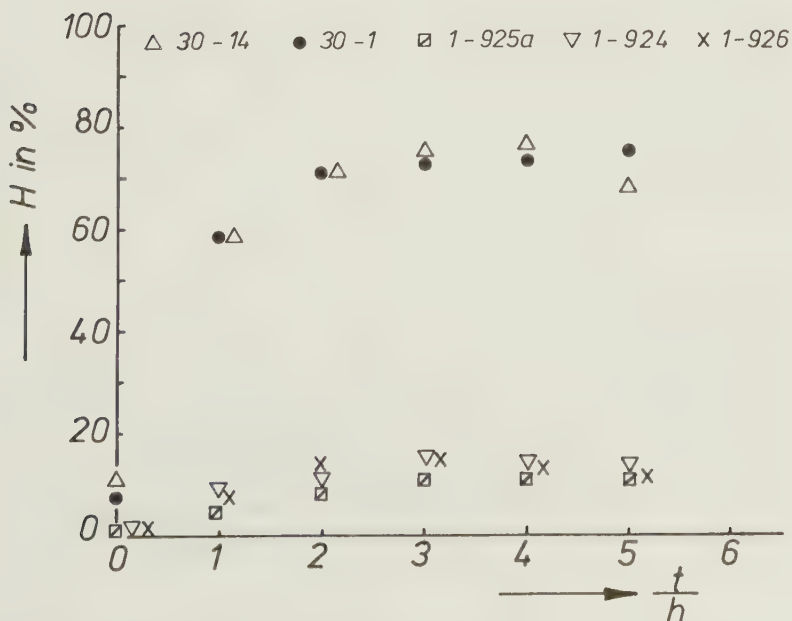
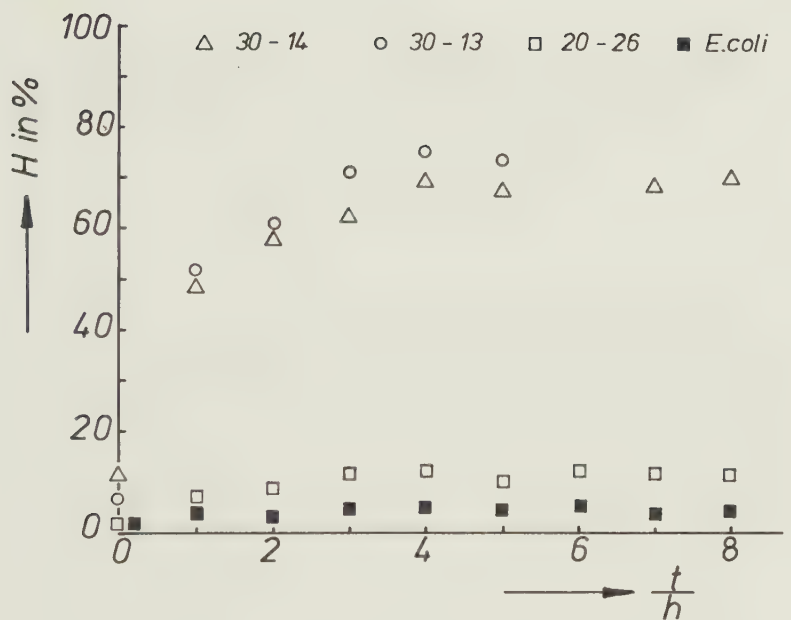


Abb. 7a, b: Reassoziation mit  $^3\text{H}$ -markierter DNA aus der nif-Typ-Segregante 30-14

Legende zu Abb. 7a, b: 20-26 = *Rhizobium meliloti*  
30-1, 30-13, 30-14 = nif-Typ-Segregante  
1-924, 1-926 = car-Typ-Segregante  
1-925a = min-Typ-Segregante

1-924 und 1-926 sowie der min-Typ-Segregante 1-925a erhält man wiederum nur einen sehr niedrigen Hybridisierungsgrad. Im einzelnen erhalten wir für *R.meliloti* 2o-26 den Wert  $H = 12\%$ , für die nif-Typ-Segreganten 3o-1 und 3o-13  $H = 100\%$ , für die car-Typ-Segreganten 1-924 und 1-926  $H = 12-15\%$  und für die min-Typ-Segregante 1-925a ebenfalls einen Wert von  $12\%$ .

In Abb. 8 ist die Hybridisierung von zwei *Rhizobium meliloti*-Stämmen 2o11 und Sa1oB61, der nif-Typ-Segregante 3o-14 und der min-Typ-Segregante 1-925a mit "heißer" DNA aus *R.meliloti* 2o-26 dargestellt. Man erkennt, daß die Selbsthybridisierung ähnlich wie in Abb. 7 etwa  $75\%$  beträgt. Die negative Kontrolle (*E.coli*) betrug wie in Abb. 7a  $5\%$  und ist der Übersicht halber wieder weggelassen worden. Die Sättigungswerte werden wieder jeweils nach etwa 4 Stunden erreicht. Der Endwert der Hybridisierung für 2o11 ist etwa so groß wie der Wert der Selbsthybridisierung von 2o-26. Man muß daraus schließen, daß diese beiden Stämme wieder mehr oder weniger identisch sind. Sie zeigen mit *R.meliloti* Sa1oB61 immer noch einen hohen Verwandtschaftsgrad. Der Hybridisierungsgrad dieses Stammes ist etwa  $5\%$  geringer. Dagegen ist die Basenhomologie mit der nif-Typ-Segregante 3o-14 und der min-Typ-Segregante 1-925a deutlich geringer. Es ergeben sich in der Sättigung die Werte  $H = 5\%$  bzw.  $H = 16\%$ . Der letzte Wert stimmt im Rahmen des Fehlers mit dem analogen Ergebnis der Abb. 7b überein ( $H = 12\%$ ).

In den Abb. 9 und 1o wurden die Proben nicht zu jeder vollen Stunde, sondern anfangs alle 15 Minuten und dann nach 1.5 h, 7 h und 23 h entnommen. Diese Art der Versuchsführung war notwendig, um das zeitliche Verhalten der Renaturierung und damit das Erreichen des Sättigungswertes genauer zu erfassen (vgl. S. 36). Wir besprechen diese Versuche erst jetzt, um eine übersichtliche Reihenfolge der Diskussion der einzelnen Stämme zu garantieren. Man erkennt, daß sich zwischen  $t = 7$  h und  $t = 23$  h innerhalb des Fehlers praktisch nichts mehr

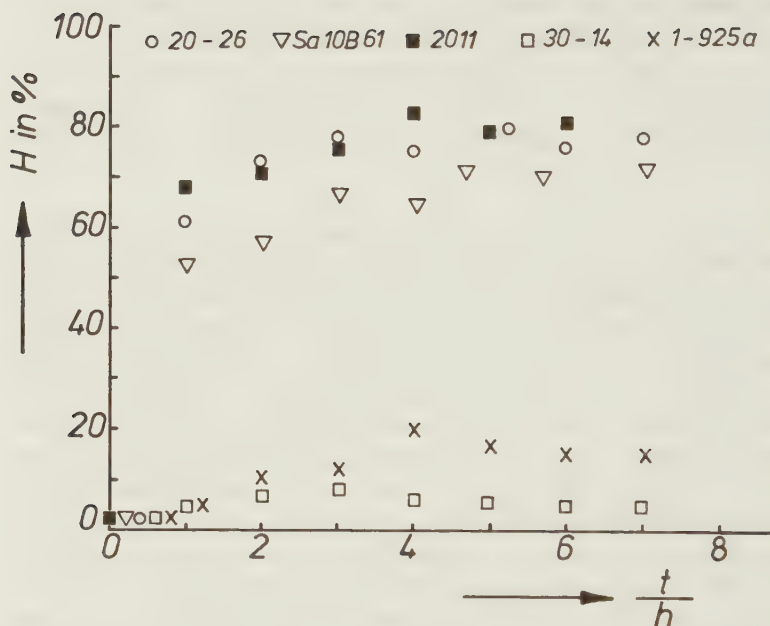


Abb. 8: Reassoziation mit  $^3\text{H}$ -markierter DNA aus *Rhizobium meliloti* 20-26  
 20-26, Sa10B61, 2011 = *Rhizobium meliloti*  
 30-14 = nif-Typ-Segregante  
 1-925a = min-Typ-Segregante

ändert. Andererseits liegen auch die Werte bei 1.5 h nicht viel tiefer als die Werte bei 7 h. Man wird also die Sättigung etwa im Bereich von 2 bis 7 h erreichen. Dies begründet die Zeitachse für alle übrigen Reassoziationsversuche (Abb. 7a/b; Abb. 8; Abb. 11; Abb. 12). Wir diskutieren nun die Abb. 9 im einzelnen. *Rhizobium meliloti*-DNA aus 20-26 wurde gegen DNA aus *R. meliloti* 2011, Ak208, MVII-1, *R. leguminosarum* 30132 und *R. trifolii* 30141 reassoziert. Man erkennt, daß die

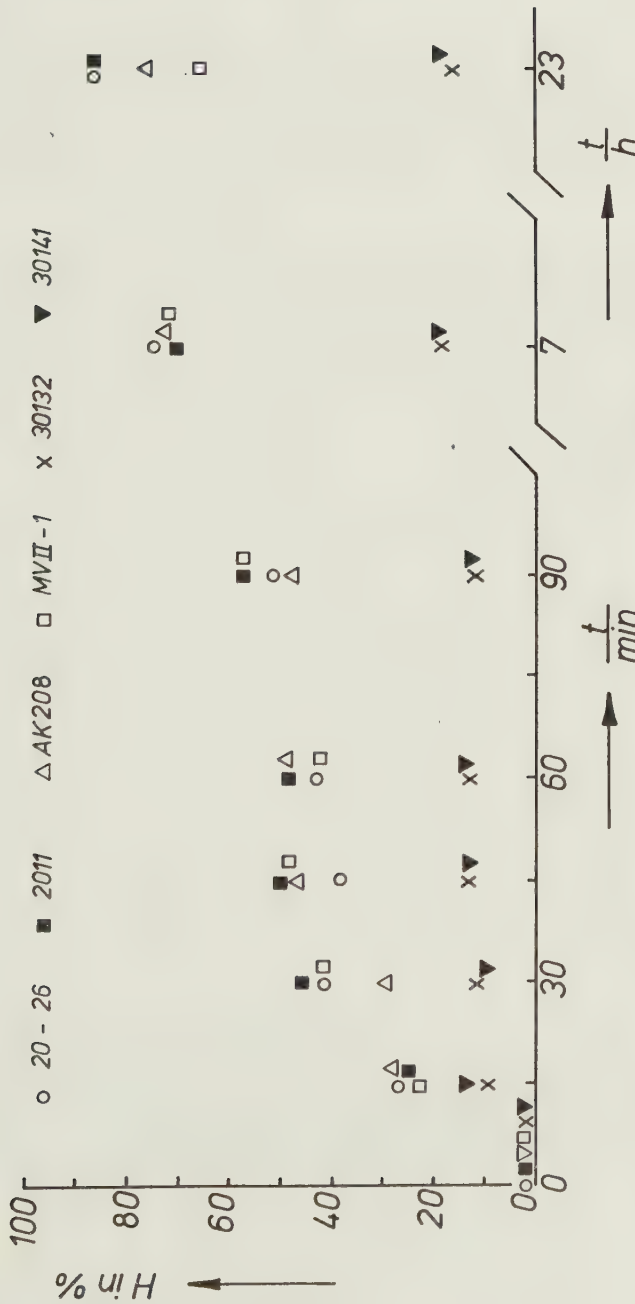


Abb. 9: Reassoziation mit  $^3\text{H}$ -markierter DNA aus *Rhizobium meliloti* 20-26

Legende zu Abb. 9: 2o-26, 2o11, AK2o8, MVII-1 = *Rhizobium meliloti*

3o132 = *Rhizobium leguminosarum*

3o141 = *Rhizobium trifolii*

*R.meliloti*-Stämme offensichtlich identisch sind. Dies stimmt bezüglich des Stammes 2o11 mit Abb. 8 überein. Die Verwandtschaft von *R.meliloti* 2o-26 mit *R.leguminosarum* 3o132 und *R.trifolii* 3o141 ist gering. Man erhält beide Male eine Hybridisierungsrate von etwa 15%.

Während sich Abb. 9 mit der Basenhomologie von *R.meliloti*-Stämmen untereinander und mit *R.leguminosarum* 3o132 und *R.trifolii* 3o141 beschäftigt, sind in Abb. 1o Hybridisierungen gegen eine "heiße" *R.leguminosarum*-DNA LVII-1 dargestellt. Hier wird in keinem Fall eine Hybridisierungsrate in der Nähe der Selbsthybridisierung erreicht. Die untersuchten Stämme zerfallen vielmehr in zwei Gruppen. DNA aus *R.leguminosarum* 3oo, 3o132 und *R.phaseoli* 3o137 zeigt mit *R.leguminosarum* LVII-1-DNA jeweils etwa den gleichen Hybridisierungsgrad von 5o%. Die DNA der übrigen Stämme zeigt keine Reassoziatio.

In Abb. 11 ist die Hybridisierung von markierter DNA aus *Rhizobium japonicum* CB18o9 gegen DNA aus *R.japonicum* 3Ib1, *R.lupini* 1o319, *nif*-Typ 3o-14, *R.leguminosarum* 3oo, *R.phaseoli* 3o137, *R.trifolii* o4o3 und *R.meliloti* Sa1oB61 gezeigt. Diese Stämme wurden in einem Versuch reassoziert, Übersicht halber aber auf zwei Schaubilder verteilt. Die positive Kontrolle *R.japonicum* CB18o9 wurde in beide Bilder aufgenommen. Die höchste Hybridisierungsrate von 45% findet man bei *R.lupini* 1o319, etwas darunter liegt mit 35% *R.japonicum* 3Ib1. Auch die *nif*-Typ-Segregante 3o-14 hebt sich mit 25% noch deutlich von den restlichen *Rhizobien* ab, die alle unter 1o% liegen.

Abb. 12 bringt die Hybridisierungsraten von <sup>3</sup>H-markierter DNA aus *R.lupini* Wu425 und DNA folgender Stämme: *Rhizobium lupini* 1o319, *R.japonicum* 3Ib1, *nif*-Typ-Segregante 3o-14, *R.phaseoli* 3o137, *R.trifolii* o4o3 und *R.meliloti* Sa1oB61. Wie bei Abb. 11 wurden die 7 Stämme auf zwei Teilabbildungen



Abb. 10: Reassoziation mit  $^3\text{H}$ -markierter DNA aus *Rhizobium leguminosarum* LVII-1

Legende zu Abb. 10: LVII-1, 30132, 300 = *Rhizobium leguminosarum*  
CB1809, 31b1 = *Rhizobium japonicum*  
30137 = *Rhizobium phaseoli*  
10319, Wu425 = *Rhizobium lupini*  
30-14 = nif-Typ-Segregante

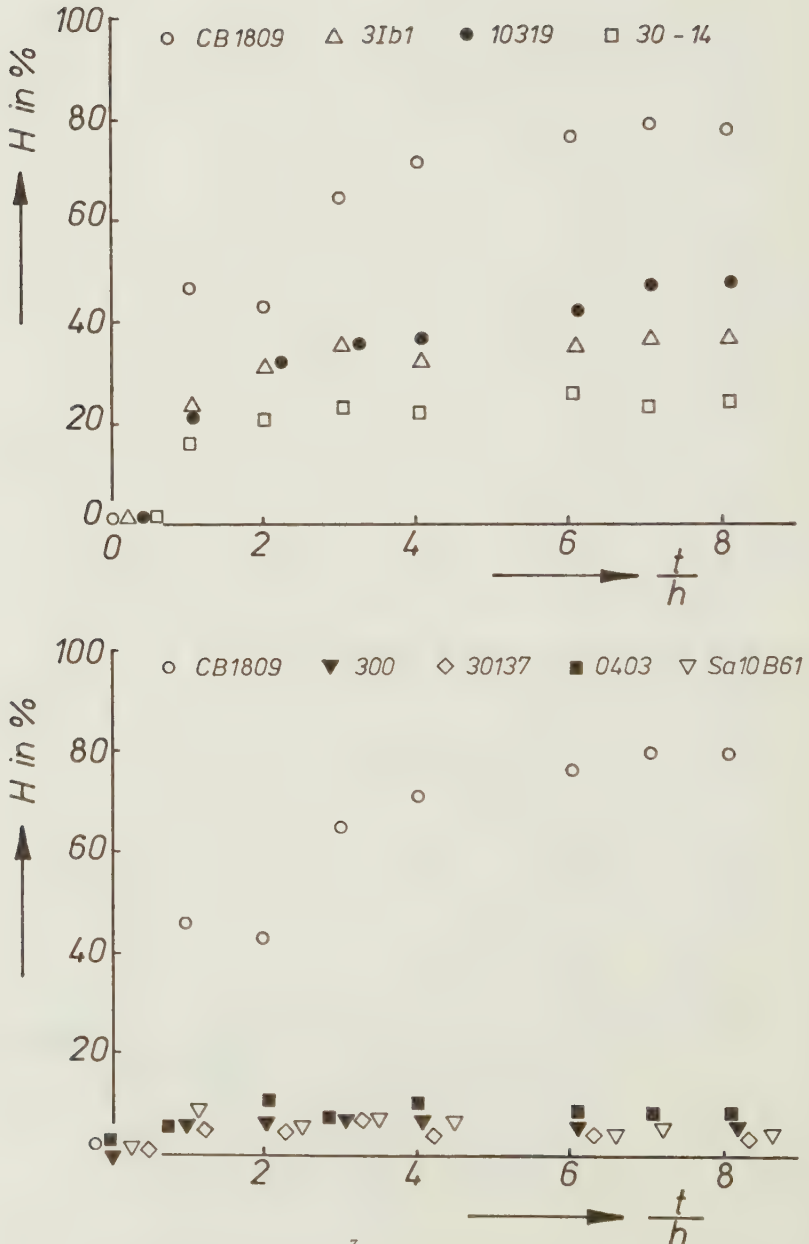


Abb. 11: Reassoziation mit  $^3\text{H}$ -markierter DNA aus *Rhizobium japonicum* CB1809

Legende zu Abb. 11: CB18o9, 3Ib1 = *Rhizobium japonicum*

1o319 = *Rhizobium lupini*

3o-14 = nif-Typ-Segregante

3oo = *Rhizobium leguminosarum*

3o137 = *Rhizobium phaseoli*

o4o3 = *Rhizobium trifolii*

Sa1oB61 = *Rhizobium meliloti*

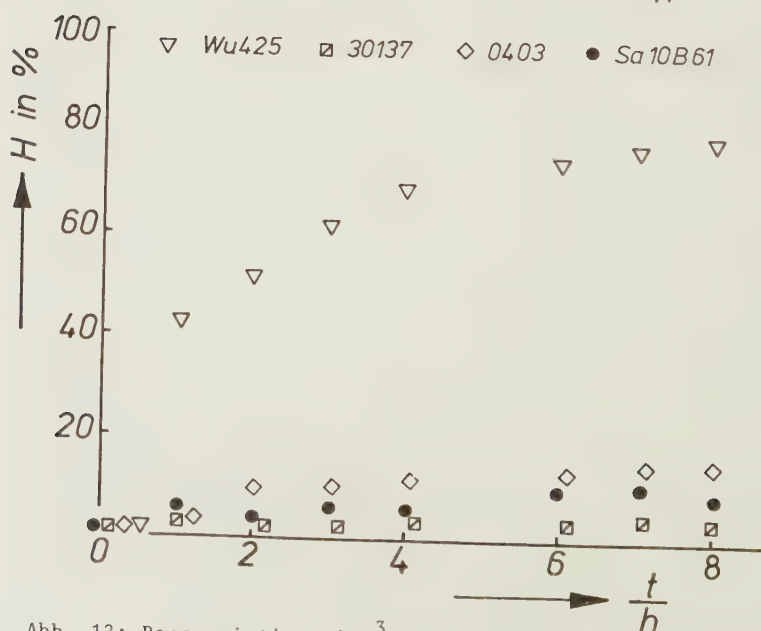
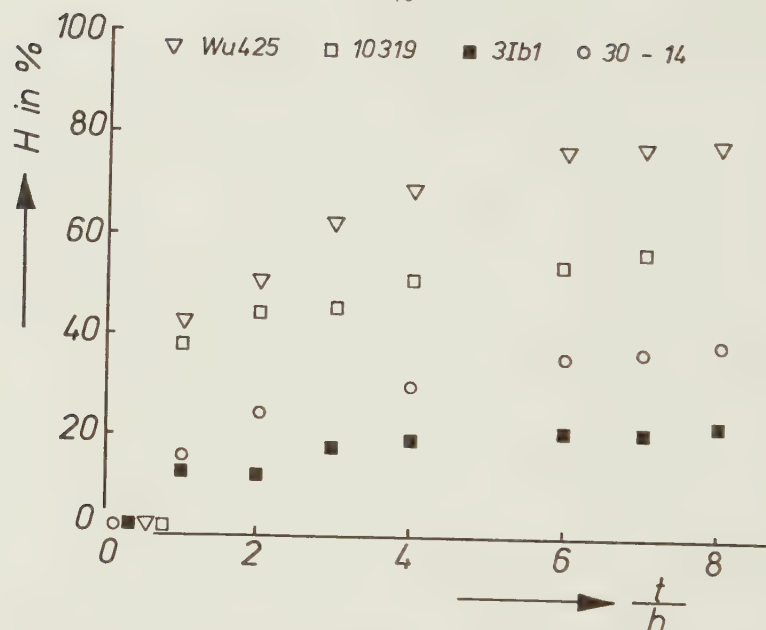


Abb. 12: Reassoziation mit  $^3\text{H}$ -markierter DNA aus Rhizobium lupini Wu425

Legende zu Abb. 12: Wu425, 1o319 = *Rhizobium lupini*  
3Ib1 = *Rhizobium japonicum*  
3o-14 = nif-Typ-Segregante  
3o137 = *Rhizobium phaseoli*  
o4o3 = *Rhizobium trifolii*  
Sa1oB61 = *Rhizobium meliloti*

dargestellt. Die niedrigsten Hybridisierungsraten zeigten die Stämme *R.meliloti* Sa1oB61 (10%), *R.trifolii* o4o3 (15%), *R.japonicum* 3Ib1 (20%). Die nif-Typ-Segregante 3o-14 dagegen hat einen Hybridisierungsgrad von 40%, während *R.lupini* 1o319 bereits 60% aufweist.

#### 5.6 Fragmentmuster von *Rhizobium*-Stämmen und ihren Segreganten

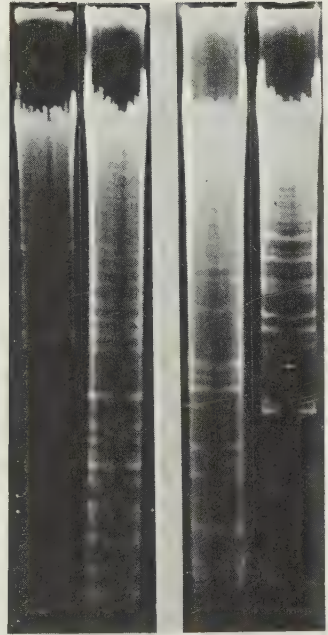
Vor kurzem wurden von Gingeras et al. /Gingeras et al., 1978/ sowie von Zain und Roberts /Zain und Roberts, 1977/ zwei neue Restriktionsenzyme aus den Stämmen *Xanthomonas holcicola* und *Xanthomonas badrii* isoliert. Diese Enzyme spalten z.B.  $\lambda$  - und Adeno-DNA in nur wenige Fragmente. Man kann deshalb erwarten, daß die Fragmentierung auch chromosomaler DNA noch gut auflösbare Banden in der Elektrophorese ergibt. Ein Vergleich der Fragmentmuster könnte dann unsere bisherigen Charakterisierungen von *Rhizobien*-DNA sinnvoll ergänzen. Tatsächlich ergeben *Xba*-Fragmente immer eine übersichtliche Bandenstruktur (vgl. Abb. 14, S. 48). Die Auflösung der Fragmentbanden bei *Xho* ist auf Grund ihrer Vielzahl nicht so gut (vgl. Abb. 13, S. 48). Dafür ist sie vollständiger. In den Abb. 13 - 16 ist nur eine Auswahl der untersuchten Gele gezeigt. Insgesamt wurden viele Stämme unterschiedlicher Herkunft von *Rhizobium meliloti*, *R.leguminosarum*, *R. trifolii* und *R.lupini* sowie *Rhizobium*-Segreganten untersucht.

Die WT-Stämme *Rhizobium meliloti* 2o11 und Sa1oB61 zeigten bei Spaltung mit beiden Enzymen ein fast identisches Fragmentmuster (vgl. Abb. 13, S. 48). Dagegen findet man weder bei den WT-*Rhizobien* *R.leguminosarum* LVII-1 und 3oo noch bei *R.trifolii* 3o141 und *R.trifolii* TVI-1 eine Übereinstimmung im Bandenmuster (vgl. Abb. 14, S. 48). Dieselbe gute Übereinstimmung im Fragmentmuster sowohl der *Xba*- als der *Xho*-Spaltung wie bei den *R.meliloti*-Stämmen weisen die



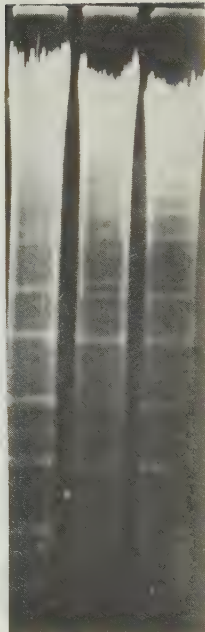
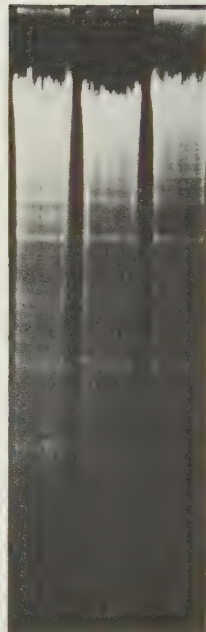
2o11 Sa1oB61

Abb. 13: Xho-Spaltung von DNA  
aus *Rhizobium meliloti* 2o11  
und Sa1oB61



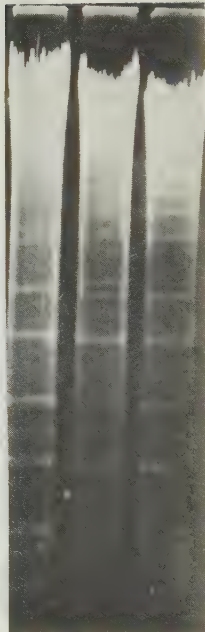
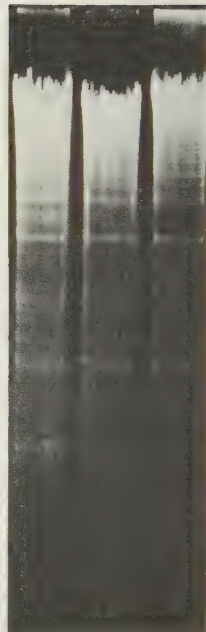
LVII-1 3oo TVII-1 3o141

Abb. 14: Xba-Spaltung von DNA  
aus *Rhizobium leguminosarum*  
LVII-1 und 3oo sowie *Rhizobium*  
*trifolii* TVI-1 und 3o141



3o-1 3o-14 1-34 1-44 1-56

Abb. 15: Xho-Spaltung von DNA aus den nif-Typ-Segreganten 3o-1 und 3o-14 sowie den car-Typ-Segreganten 1-34, 1-44 und 1-56



3o-1 3o-13 3o-14 1-34 1-44 1-56

Abb. 16: Xba-Spaltung von DNA aus den nif-Typ-Segreganten 3o-1, 3o-13, 3o-14 und den car-Typ-Segreganten 1-34, 1-44 und 1-56

nif-Typ-Segreganten 3o-1, 3o-13 und 3o-14 und im wesentlichen bis auf einige wenige Banden auch die car-Typ-Segreganten 1-34, 1-44 und 1-56 auf (vgl. Abb. 15 und 16).

## 6. Diskussion

Die symbiontische Stickstoffbindung der Rhizobien entwickelte sich in den letzten Jahren zu einem Schwerpunkt internationaler Forschung. Ziel aller dieser Arbeiten ist es, die biochemischen, genetischen und molekularbiologischen Grundlagen der Wechselwirkung zwischen Bakterien und Leguminosenwirtspflanzen zu verstehen, um mit dieser Kenntnis den Bereich der pflanzlichen Partner experimentell ausweiten zu können auf weitere Pflanzengruppen, etwa auf die wichtigsten Pflanzen menschlicher Ernährung wie Cerealien und Kartoffeln. Da bei der Leguminosensymbiose fast alle genetischen Faktoren zum Aufbau des Systems durch den bakteriellen Partner eingebracht werden, der pflanzliche Wirt jedoch lediglich in die genetische Potenz der Bakterien regulierend eingreift, müssen zunächst Struktur und Funktion des genetischen Apparates der Rhizobien aufgeklärt werden. Nur auf dieser Grundlage ließen sich dann gezielte Fragen zur eventuellen Ausweitung der Symbiose formulieren. Vorliegende Arbeit ist ein Beitrag zur Genetik der Rhizobien.

In den vergangenen Jahren konnte in der Erlanger Mikrobiologie gezeigt werden, daß Wild-Typ-Rhizobien unter geeigneten Kulturbedingungen eine gesetzmäßige Segregation in Bakterienstämme neuer phänotypischer und genotypischer Merkmalskombination ausführen. Das heißt das komplexe Genom infektiöser ( $\text{inf}^+$ ) und symbiontisch effektiver ( $\text{nif}^+$ ) Rhizobien, das den Bakterien die vielfältigen Wechselwirkungen mit der Pflanze bis hin zum Aufbau stickstoffbindender Wurzelknöllchen ermöglicht, ordnet sich neu zu einfacheren Genomen, deren bakterielle Träger höhere vitale Effizienz unter freilebenden Bedingungen aufweisen als der genetisch komplexere Wildtyp. Dieses Segregationschema des Wildtyp zeigt, daß sein Genom als Faktorenmosaik höchster Komplexität anzusehen ist. Aus diesem Mosaik lassen sich neue Kombinationen genetischer Faktoren zusammensetzen, die einfacher sind, aber auch wieder ein vollständiges Bild,

d.h. lebensfähige Bakterien ergeben. Aus dem genetischen Wild-Typ-Mosaik werden durch Umstrukturierung mindestens drei verschiedene Segreganten-Mosaiken mit neuer und einfacherer, daher für freilebende Bedingungen effektiveren Kombination genetischer Faktoren. Da wohl anzunehmen ist, daß sich im Segregationsschema die Umkehr schrittweiser Genomkombinationen wieder spiegelt, die in der Evolutionsgeschichte zur Entwicklung von WT-Rhizobien geführt hat, sollte auch diese Kombination experimentell zugänglich sein. Hieran wird z.Zt. gearbeitet.

Vorliegender Arbeit lag die Aufgabe zugrunde von der DNA von WT-Rhizobien und ihren Segreganten möglichst viele biochemische, biophysikalische und molekularbiologische Daten zu gewinnen, um durch deren Vergleich Einblick in die DNA-Struktur des Wildtyps und in die Neukombination von Teilen dieser DNA in den Segreganten zu erhalten.

Zur Charakterisierung der DNA des Wildtyps und der Segreganten wurde ihre Dichte  $\rho$  als Ausdruck ihres GC-Gehalts durch Schmelzkurven (vgl. Tabelle 2, S. 24) und durch analytische Ultrazentrifugation im CsCl-Gradienten (vgl. Tabelle 3, S. 26) gemessen. In Tabelle 6 ist nochmal das Segregationsmuster der Einleitung, nunmehr vervollständigt durch die Dichten der chromosomalen und extrachromosomalen DNA der einzelnen Rhizobium-Typen, dargestellt.

Die allgemeine bakteriologische Charakterisierung der verschiedenen Stämme sieht folgendermaßen aus:

WT: effektiv nodulierend

nif-Typ: besitzt freilebend voll dereprimierte Nitrogenase  
= nif<sup>+</sup>

car-Typ: carotinoid-pigmentiert, besitzt hocheffektives Conjugationssystem (Heumann et al., 1971, 1973)

min-Typ: Endstadium der Segregation

Alle Segreganten haben wesentlich kürzere Generationszeiten als der Wildtyp.



Abb. 17: Einheitliche Kolonien einer nif-Typ-Segregante  
entstanden durch Segregation von *Rhizobium meliloti*



Abb. 18: Segregation der nif-Typ-Segregante aus Abb. 17 in  
car-Typ und min-Typ

| Ausgangsstamm | $\rho$ (g/cm <sup>3</sup> ) | Segreganten       | $\rho$ (g/cm <sup>3</sup> ) |
|---------------|-----------------------------|-------------------|-----------------------------|
| WT            | 1.722<br>(1.717)            | nif-Typ           | 1.723<br>(1.717)            |
|               |                             | car-Typ           | 1.725                       |
|               |                             | min-Typ           | 1.717                       |
| nif-Typ       | 1.723<br>(1.717)            | car-Typ           | 1.725                       |
|               |                             | min-Typ           | 1.717                       |
| car-Typ       | 1.725                       | min-Typ           | 1.717                       |
| min-Typ       | 1.717                       | keine Segreganten |                             |

Tabelle 6: Dichten  $\rho$  von chromosomaler und extrachromosomaler DNA aus WT-Rhizobien und Rhizobium-Segreganten.

Wert in ( ) = Dichten extrachromosomaler DNA

Die Dichte der chromosomalen und der extrachromosomalen DNA des Wildtyps stimmt weitgehend mit Literaturwerten überein (Gibbins und Gregory, 1972). Auch zwischen den WT-Werten verschiedener Wirtsgruppen gibt es bei der DNA-Dichte keine erheblichen Abweichungen. Die Dichte der chromosomalen DNA der nif-Typ-Segregante ist gegenüber der des Wildtyps erhöht, während die Werte der extrachromosomalen DNA vom Wildtyp und nif-Typ völlig identisch sind. Die Annahme liegt nahe, daß beide Stämme ähnliches oder gar gleiches Plasmidmuster besitzen. Weiter unten wird gezeigt, daß diese Vermutung durch zusätzliche Daten gestützt ist. Die car-Typ-Segregante besitzt keine extrachromosomale DNA, die Dichte der chromosomalen DNA ist weiter erhöht. Es ist bisher nicht möglich, die Dichtezunahmen chromosomaler DNA vom Wildtyp über nif-Typ zu car-Typ plausibel zu erklären. Die min-Typ-Segregante besitzt ebenfalls keine Plasmide, aber die Dichte ihrer chromosomalen DNA ist

identisch mit der der extrachromosomalen DNA vom Wildtyp und nif-Typ. Dies könnte darauf hinweisen, daß zum Aufbau des min-Typ-Chromosoms erhebliche Teile der extrachromosomalen WT-DNA verwandt wurden. Bisher haben wir jedoch keine weiteren Daten zur Stützung dieser Hypothese.

Der Verlauf der Schmelzkurven der DNA läßt Rückschlüsse auf ihre Heterogenität  $\sigma$ , d.h. auf die Verteilung GC-reicher oder -armer Regionen in der Gesamt-DNA zu. Die Segreganten-DNA vom nif-Typ und car-Typ zeigt eine abnehmende Heterogenität. Die relativ hohe Heterogenität des nif-Typs erklärt sich leicht aus den verschiedenen Dichten von chromosomaler und extrachromosomaler DNA. Den geringsten Grad von Heterogenität weist die min-Typ-DNA auf. Ein Vergleich mit chromosomaler DNA der anderen Rhizobium-Typen ist jedoch solange wenig sinnvoll, wie nicht die Herkunft dieser DNA geklärt ist.

In allen genetischen Fragen zur symbiontischen Stickstoffbindung durch Rhizobium spielt die extrachromosomale DNA dieser Bakterien eine besondere Rolle, da allgemein die Hypothese vertreten wird, daß die genetische Information zum Aufbau des Enzymsystems Nitrogenase Plasmid-codiert vorliegen könne. Beim Vergleich der extrachromosomalen DNA vom Wildtyp verschiedener Wirtsgruppen, d.h. aus Rhizobium meliloti, R. leguminosarum und R. trifolii wurden hinsichtlich der Dichte einheitliche Werte von  $\rho = 1.717 \text{ g/cm}^3$  erhalten. Vergleicht man jedoch die Fragmentmuster, die nach Spaltung mit den Restriktionsenzymen EcoRI und Sma erhalten werden, so findet man keine Übereinstimmung. Dies deutet daraufhin, daß zwar die Herkunft der extrachromosomalen DNA verschiedener Wirtsgruppen identisch ist, ihre genetische Information jedoch erhebliche Unterschiede aufweist. Eingehendere Vergleichsdaten wurden für extrachromosomale R. trifolii- und nif-Typ-DNA gewonnen. In der elektronenmikroskopischen Präparation zeigte sich, daß beide Stämme sehr große Plasmide zwischen 80 und 110 um besitzen. In den nif-Typ-Segreganten fand man zusätz-

lich zu diesen großen Plasmiden - allerdings weniger häufig - mittlere Plasmide von 12 - 15 um und vereinzelt kleine von 5 um Länge. Die Übereinstimmung dieser Stämme hinsichtlich ihrer großen Plasmide sowie der einheitlichen Plasmiddichte von  $\rho = 1.717 \text{ g/cm}^3$  könnte ein Hinweis auf einen gemeinsamen Ursprung dieser DNA sein.

Nachdem bisher durch Dichtebestimmung und Plasmiddarstellung eine grobe Charakterisierung von WT-DNA verschiedener Wirtsklassen und ihrer Segreganten durchgeführt wurde, sollte nun die molekulargenetische Verwandtschaft einzelner Stämme durch den Vergleich ihrer Basenhomologie über Filterhybridisierung und über Reassoziationskinetiken bestimmt werden. Die Filterhybridisierung ist relativ ungenau, da bei dieser Methode die Selbsthybridisierung nicht höher als 30% ist. Es wurde daher durch Filterhybridisierung lediglich die DNA von *Rhizobium meliloti*-Wild-Typ und *Rhizobium*-Segreganten untersucht. Dabei ergab sich eine relativ geringe Basenhomologie zwischen DNA aus dem Wildtyp und aus den nif-Typ bzw. car-Typ-Segreganten. Eine hohe Hybridisierungsrate von 75% zeigten dagegen alle untersuchten nif-Typ-Segreganten untereinander.

Ein wesentlich differenzierteres Bild von der Basenhomologie der untersuchten *Rhizobien* konnte jedoch durch Reassoziationskinetiken gewonnen werden. Zunächst soll die Homologie der DNA vom Wildtyp verschiedener Wirtsklassen besprochen werden. Die höchste Einheitlichkeit zeigte die DNA von *Rhizobium meliloti*-Stämmen verschiedener Herkunft. In allen Fällen (4 verschiedene Stämme) ist hier der Grad der Reassoziation zwischen verschiedenen Stämmen gleich dem der Selbstreassoziation. Die Homologie zwischen verschiedenen *R. leguminosarum*-Stämmen hingegen ist deutlich geringer, sie liegt bei 73%. Insgesamt gesehen ist innerhalb der schnell wachsenden Wirtsgruppen lediglich eine deutliche DNA-Verwandtschaft zwischen *R. leguminosarum* und *R. phaseoli* festzustellen (68% Homologie), während zwischen der DNA

aller anderen schnell wachsenden Rhizobien nur geringe Homologie besteht. Anders ist es beim Vergleich der langsam wachsenden WT-Rhizobien. Hier besteht sowohl zwischen den beiden Arten *R. lupini* und *R. japonicum* eine deutliche Homologie von 27 - 61%, als auch bei allen untersuchten Fällen innerhalb der beiden Arten bis zu 75%. Eine Reassoziation zwischen DNA von langsam wachsenden und schnell wachsenden WT-Rhizobien ist nicht mehr nachweisbar. Ein erschöpfender Vergleich der DNA verschiedener Segreganten-Typen untereinander und mit der WT-DNA ist Gegenstand einer gesonderten Arbeit. Hier wird lediglich gezeigt, daß die DNA der nif-Typ-Segreganten mit *R. lupini* WT-DNA 50% Homologie, mit *R. japonicum* 33% Homologie aufweist. Ähnlich konnte zwischen der DNA der min-Typ-Segregante und der aus *R. meliloti*-Wild-Typ eine 22%ige Homologie aufgezeigt werden. Eine Zusammenfassung aller Hybridisierungsdaten zeigt Tabelle 7.

| Rhizobium      | Stamm-Nr. | Homologie in % |
|----------------|-----------|----------------|
| nif-Typ*       | 30-14     | 100            |
| "              | 30-13     | 100            |
| "              | 30-1      | 100            |
| car-Typ        | 1-925a    | 15             |
| "              | 1-924     | 17             |
| "              | 1-926     | 16             |
| meliloti       | 20-26     | 14             |
| leguminosarum* | LVII-1    | 100            |
| "              | 30132     | 73             |
| "              | 300       | 67             |
| phaseoli       | 30137     | 68             |
| japonicum      | 3Ib1      | 12             |
| "              | CB1809    | 8              |
| lupini         | Wu425     | 11             |
| "              | 10319     | 8              |
| nif-Typ        | 30-14     | 10             |

| Rhizobium     | Stamm-Nr. | Homologie in % |
|---------------|-----------|----------------|
| meliloti *    | 20-26     | 100            |
| "             | 2011      | 100            |
| "             | AK208     | 95             |
| "             | Sa10B61   | 92             |
| "             | MVII-1    | 91             |
| trifolii      | 30141     | 24             |
| leguminosarum | 30132     | 23             |
| car-Typ       | 1-925a    | 22             |
| nif-Typ       | 30-14     | 8              |
| lupini *      | Wn425     | 100            |
| "             | 10319     | 75             |
| nif-Typ       | 30-14     | 50             |
| trifolii      | 0403      | 18             |
| japonicum     | 31b1      | 27             |
| phaseoli      | 30137     | 5              |
| japonicum *   | CB1809    | 100            |
| "             | 31b1      | 44             |
| lupini        | 10319     | 61             |
| nif-Typ       | 30-14     | 33             |
| trifolii      | 0403      | 10             |
| meliloti      | Sa10B61   | 6              |
| leguminosarum | 300       | 5              |
| phaseoli      | 30137     | 4              |

Tabelle 7: Homologie von DNA aus verschiedenen WT-Rhizobien und Rhizobium-Segreganten.

Die radioaktiv markierte DNA ist jeweils mit einem \* gekennzeichnet.

Diese stichprobenartigen Verwandtschaftsanalysen stützen zwar grundsätzlich den genetischen Zusammenhang zwischen WT-Rhizobien und den verschiedenen Segreganten, zum detaillierten Verständnis der Umorganisation der Genome bei der Segregation reichen sie noch nicht aus.

Bei der Charakterisierung von Plasmid-DNA mittlerer Größenordnung hat sich die Restriktionsanalyse, d.h. die Spaltung der DNA durch bestimmte Restriktionsendonukleasen und die anschließende Zahl- und Größenbestimmung der Fragmente durch Gelelektrophorese als unentbehrliches und wirksames Hilfsmittel in allen gentechnologischen Arbeiten bewährt. Versucht man mit den gebräuchlichen Restriktionsenzymen chromosomale DNA oder Plasmid-DNA von der Größe der Rhizobien-Plasmide (80 - 110 um) zu analysieren, so erhält man eine Vielzahl von eng beieinander liegenden, schlecht identifizierbaren Banden. Lediglich mithilfe von Restriktionsenzymen, die nur wenige Schnittstellen auf einer DNA finden, kann man hoffen, von hochmolekularer DNA auflösbare Fragmentmuster zu bekommen. Diese Anforderungen erfüllen die kürzlich beschriebenen Restriktionsenzyme aus *Xanthomonas badrii* und *Xanthomonas holcicola* /Zain und Roberts, 1977; Gingeras et al., 1978/. Die Fragmentierung der Gesamt-DNA von Rhizobien und deren Segreganten durch diese Enzyme liefert in der Gelelektrophorese auflösbare Bandenmuster. Hiermit steht uns eine weitere sehr spezifische Methode zum detaillierten Vergleich der Rhizobium-WT-DNA untereinander und mit der der Segreganten zur Verfügung. Diese Methode hat neben ihrer besseren Auflösung gegenüber der Reassoziations-technik den weiteren Vorteil, daß einmal unter standardisierten Bedingungen hergestellte Fragmentmuster für weitere Vergleiche jederzeit zur Verfügung stehen und, daß nicht wie bei der Reassociation bei jedem neuen Vergleich auch die DNA des Vergleichsstammes neu präpariert werden muß. Unsere Ergebnisse beim Vergleich der mit den Restriktionsenzymen *Xba* und *Xho* hergestellten Fragmentmuster bestätigen die Reassoziationsversuche. Die *R.meliloti*-WT-DNA verschiedener Herkunft ist untereinander identisch, während die Muster verschiedener *R.leguminosarum*-WT-DNA nur in wenigen Banden Übereinstimmung zeigt. Ähnlich verschieden sind die Fragmentmuster der DNA zweier *R.trifolii*-Stämme. Von Segreganten-DNA wurden bisher die Fragmentmuster verschiedener *nif*-Typ-Stämme und verschiedener *car*-Typ-Stämme aufgestellt. Innerhalb einer Segregantenklasse erhält man

immer sehr einheitliche Muster, während zwischen den Klassen keine Vergleichbarkeit festzustellen ist. Auch die Spaltmuster von Rhizobium-Wild-Typ und den nif-Typ- bzw. car-Typ-Segreganten weisen keine Ähnlichkeit auf.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß unsere biochemischen und biophysikalischen Methoden zur DNA-Analyse sich als ein wirksames Werkzeug erwiesen haben, um den Grad der genetischen Verwandtschaft verschiedener WT-Rhizobien festzulegen, und um zum Verständnis der molekularen Neuordnung bei der Segregation dieser Stämme und zur Kenntnis der Genomstruktur der Segreganten wesentlich beizutragen.

## Literatur

- Bazaral, M. und D.R.Helinski: Circular DNA Forms of Colicino-genic Factors E1, E2 and E3 from *Escherichia coli*.  
J. Mol. Biol. 36, 185 - 194 (1968)
- Britten, R.J. und D.E.Kohne: Repeated Sequences in DNA.  
Science 161, 529 - 540 (1971)
- Davis, R.W., M.Simon und M.Davidson: Electron Microscope Hetero-duplex Methods for Mapping Regions of Base Sequence Homolo-gy in Nucleic Acids.  
Methods in Enzymology XXI, Part D, 413 - 428 (1971)
- De Ley, J.: Reexamination of the Association Between Melting Point, Buoyant Density and Chemical Base Composition of Desoxyribonucleic Acid.  
J. Bact. 101, 738 - 754 (1970)
- Gibbins, A.M. und K.F.Gregory: Relatedness Among *Rhizobium* and *Agrobacterium* Species Determined by Three Methods of Nuc-leic Acid Hybridization.  
J. Bact. 111, 129 - 141 (1972)
- Gillespie, D. und S.Spiegelmann: A Quantitative Assay for DNA-RNA Hybrids with DNA immobilized on a Membrane.  
J. Mol. Biol. 12, 829 - 842 (1965)
- Gingeras, T.R., P.A. Myers, J.A. Olson, F.A. Handberg und R.J. Roberts: A New Specific Endonuclease Present in *Xan-thomonas holcicola*, *Xanthomonas papavericola* *Brevibac-terium luteum*.  
J. Mol. Biol. 118, 113 - 122 (1978)

Heumann, W., A. Pühler und E. Wagner: The Two Transfer Regions of the *Rhizobium lupini* Conjugation.

I. Fertility Factor Elimination and One Way Transfer.  
Molec. Gen. Genet. 113, 308 - 315 (1971)

Heumann, W., A. Pühler und E. Wagner: The Two Transfer Regions fo the *Rhizobium lupini* Conjugation.

II. Genetic Characterization of the Transferred Chromosomal Segments.

Molec. Gen. Genet. 126, 267 - 274 (1973)

Hirschmann, S.Z. und G. Felsenfeld: Determination of DNA Composition and Concentration by Spectral Analysis.

J. Mol. Biol. 16, 347 - 358 (1966)

Ifft, J.B., D.H. Volt und J. Vinograd: The Determination of Density Distribution and Density Gradients in Binary Solution at Equilibrium in the Ultracentrifuge.

J. Phys. Chem. 65, 1138 - 1145 (1961)

Lang, P. und N. Mitani: Simplified Quantitative Electron Microscopy of Biopolymers.

Biopolymers 9, 373 - 379 (1970)

Mandel, M. und J. Marmur: Use of Ultraviolet Absorbance-Temperature Profile for Determining the Guanine plus Cytosine Content of DNA.

Methods in Enzymology XII, 195 - 206 (1968)

Marmur, J. und P. Doty: Determination of the Base Composition of Desoxyribonucleic Acid from its Thermal Denaturation Temperature.

J. Mol. Biol. 5, 109 - 118 (1962)

Rigby, P.W.J., M. Dieckmann, C. Rhodes und P. Berg: Labeling DNA to high Specific Activity In Vitro by Nick Translation.

J. Mol. Biol. 113, 237 - 251 (1977)

Radlof, R., W. Bauer und J. Vinograd: A Dye Buoyant-Density Method For The Detection And Isolation of Closed Circular Duplex DNA: The Closed Circular DNA in HeLa Cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 57, 1514 - 1520 (1967)

Sharp, P.A., B. Sugden und J. Sambrook: Detection of Two Restriction Endonuclease Activities in Haemophiles parainfluenzae Using Analytical Agarose-Ethidiumbromide Electrophoresis.

Biochem. 12, 3055 - 3063 (1973)

Spitzbarth, M., A. Pühler und W. Heumann:

Arch Microbiol., im Druck (1979)

Thomas, M. und R.W. Davis: Studies on the Cleavage of Bacteriophage Lambda DNA with EcoRI Restriction Endonuclease.

J. Mol. Biol. 91, 315 - 328 (1975)

Wetmur, J.G. und N. Davidson: Kinetic of Renaturation.

J. Mol. Biol. 31, 349 - 370 (1968)

Zain, R.S. und R.J. Roberts: A New Specific Endonuclease from Xanthomonas badrii.

J. Mol. Biol. 115, 249 - 255 (1977).



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 1977 bis März 1979 im Institut für Mikrobiologie und Biochemie der Universität Erlangen-Nürnberg unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. W.Heumann ausgeführt.

Herrn Prof. Dr. W.Heumann danke ich für die Überlassung des Themas, seine intensive Betreuung, sowie sein großes Interesse am Fortgang der Arbeit. Allen Mitgliedern des Instituts danke ich für nützliche Anregungen und Diskussionsbeiträge.



## Lebenslauf

Name: Barbara Merkt

Geburtstag: 2.7.1951

Geburtsort: Leipzig

Familienstand: verheiratet seit 1973

Schulbildung: 4 Jahre Volksschule in Neckarsulm  
2 Jahre Gymnasium in Neckarsulm  
7 Jahre Gymnasium in Heilbronn

Abitur: 11.6.1970

Studium: 30.9.1970 Immatrikulation an der Universität  
Erlangen-Nürnberg für das Fach Diplom-Chemie  
1.8.1974 Diplom-Chemiker-Vorprüfung  
10.1.1977 Diplom-Biologen-Hauptprüfung

Promotion: seit 1.3.1977 bei Herrn Prof. Dr. W.Heumann  
am Institut für Mikrobiologie und Biochemie









**Offsetdruck-Fotodruck**

J. Hogl, 8520 Erlangen, Hauptstr. 109 (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990